

Fluorescence Principles and Practice for Cell Biology

细胞生物学荧光技术

原理和应用

主　编　刘爱平　　副主编　王琦琛

中国科学技术大学出版社

Fluorescence Principles for Cell Biology

细胞生物学荧光技术

原理和应用

主　　编　刘爱平

副 主 编　王琦琛

参编人员　郭　振　姚　展　郑晓东
　　　　　张文锐　王黎丽　程联胜
　　　　　陈俏俏　易启毅　赵　萍
　　　　　何海辉

中国科学技术大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学荧光技术原理和应用/刘爱平主编. —合肥:中国科学技术大学出版社,2007.2

ISBN 978-7-312-02044-5

Ⅰ. 细… Ⅱ. 刘… Ⅲ. 荧光分析—应用—细胞生物学—研究 Ⅳ. Q2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 012125 号

出版 中国科学技术大学出版社

安徽省合肥市金寨路 96 号,230026

网址:http://press.ustc.edu.cn

印刷 合肥现代印务有限公司

发行 中国科学技术大学出版社

经销 全国新华书店

开本 710 mm×960 mm 1/16

印张 20.75

插页 9

字数 466 千

版次 2007 年 2 月第 1 版

印次 2007 年 2 月第 1 次印刷

印数 1～3 000 册

定价 35.00 元

前　言

随着生命科学研究的快速发展，生物荧光技术在细胞免疫学、微生物学、分子生物学、分子遗传学、神经分子生物学、病理学、肿瘤学、临床检验学、医学、植物学等方面的应用越来越广泛；制备各种荧光生物样品的方法越来越多；用于荧光检测的仪器种类不断增加，而且也越来越先进。荧光技术已经成为生命科学研究的重要手段之一。因此，了解荧光的基本知识，熟悉荧光技术在生命科学研究中的应用，掌握常用的荧光生物样品的制备方法，了解荧光检测仪器的基本原理和操作步骤，是生命科学研究者必备的知识和技能。我们编写本书的目的，是为了给对细胞生物学荧光技术感兴趣的老师、研究生和本科生提供基本知识、相关的实验方法和技术参考。

本书共分三部分：第一部分介绍荧光的基本知识、发展史、荧光探针、活体荧光材料——绿色荧光蛋白(GFP)及最新型荧光材料——量子点；第二部分介绍荧光技术在生命科学中的应用及荧光生物样品的制备方法，其中荧光技术在细胞凋亡研究中的应用、流式细胞术在细胞生物学中的应用、荧光在细胞骨架研究中的应用、荧光原位杂交、荧光在 HER2/ErbB2/p185 研究中的应用及绿色荧光蛋白(GFP)在动植物细胞和分子生物学中的应用是中国科学技术大学生命科学学院(以下简称“我院”)多位教授科研项目中正在研究的内容；第三部分介绍了我院现已拥有的生物荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、细胞遗传工作站、活细胞荧光工作站、流式细胞仪、荧光定量 PCR 仪等荧光检测仪器的基本原理、操作步骤及注意事项。本书彩页中的大部分照片是使用我院拥有的上述各种荧光检测仪器获得的。

本书的编者为我院多年从事仪器管理的中青年教师和从事相关课题研究的硕士、博士研究生。其中第一章、第二章、第三章、第五章、第十二章第一节、第十三章、第十四章的第二、第三节及第十七章由刘爱平编写；第六章、第十五章、第十九章及第二十一章由王琦琛编写；第四章、第十四章的第一节及第十六章由张文锐编写；第七章由姚展编写；第八章由郑晓东编写；第九章由郭振编写；第十章由易启毅编写；第十一章由程联胜和陈俏俏编写；第十二章的第二节由赵萍编写；第十八章由王黎丽编写；第二十章由佴海辉编写。

在本书的编写过程中，得到了院领导的大力支持和本院“长江学者”姚雪彪、向成斌教授，“百人计划”吴缅、史庆华、田志刚教授和刘兢、魏海明教授以及许多老师和研究生的关心和帮助，在此向他们表示衷心的感谢！同时，校教务处和研究生院也给予了许多帮助，在此表示感谢。

由于荧光技术的发展相当迅速，加之编写时间仓促，水平有限，书中难免有不妥之处，恳请读者指正。

刘爱平　王琦琛

2006.06

目　录

第㈠部分

基本知识

第一章 光的基本知识

一、光的本质

光是一种可见的电磁波，是能量的辐射形式。

光子的能量(E)、频率(υ)和波长(λ)之间的关系可以由以下方程表示：

$$E=h\upsilon=hc/\lambda$$

此方程即为普朗克方程(Planck's equation)。式中 λ 为波长；υ 为频率；c 为光速，其值为 $2.997\,9\times10^{8}\,m\cdot s^{-1}$；$h$ 为普朗克常数，其值为 $6.626\,2\times10^{-34}\,J\cdot s$。由上式可以看出：光的波长越长，光子的能量越小；光的波长越短，光子的能量越大。

因此，电磁辐射可按波长长短划分为几个区域，如表 1-1 所示。由表 1-1 可以看出可见光的波长范围在电磁波谱中只是很小的一段。

表 1-1 电磁波谱

区域	波长		跃迁类型
	常用表示方法	标准(m)	
γ射线	$10^{-5}\sim10^{-3}$ nm	$10^{-12}\sim10^{-10}$	核反应
X射线	$10^{-3}\sim0.1$ nm	$10^{-10}\sim10^{-8}$	内层电子
远紫外	$10\sim200$ nm	$10^{-8}\sim(2\times10^{-7})$	中层电子
紫外	$200\sim400$ nm	$(2\times10^{-7})\sim(4\times10^{-7})$	外层价电子
可见	$400\sim760$ nm	$(4\times10^{-7})\sim(7.6\times10^{-7})$	外层价电子
红外	$0.76\sim50\ \mu m$	$(7.6\times10^{-7})\sim(5\times10^{-5})$	分子的振动与转动
远红外	$50\sim1\,000\ \mu m$	$(5\times10^{-5})\sim10^{-3}$	分子的振动与转动
微波	$0.1\sim100$ cm	$10^{-3}\sim1$	分子的转动
无线电波	$1\sim1\,000$ m	$1\sim10^{3}$	核自旋

二、光的性质

光具有粒子性与波动性，或称为波粒二象性。光的波动性表现为光有反射、折射、绕射和干涉等现象；光的粒子性(量子性)表现为原子和分子辐射能量时，是以一连串微粒子形式进行的，这种微粒子称为光子(光量子)。

在均匀透明的介质中，光沿直线传播。光在传播时，它是在与它前进方向相垂直

的平面内呈波形振动。两个波峰之间的距离为波长，波峰的大小即为该光波的振幅，不同波长的光具有不同的颜色，即光的波长不同，光的颜色也不同。而光的振幅决定光的强度，振幅越大，光的亮度越强；振幅越小，光的亮度越弱。此外，不同波长或不同频率的光，具有不同的能量，波长短（频率高）的光，其光量子的能量大；波长长（频率低）的光，其光量子的能量小。

光的波长不同，其折射率亦不同。波长越长，折射率越小；波长越短，折射率越大。因此，当一束平行白光通过棱镜后，由于组成白光的七色光的波长不同，它们的折射率各异，而被分散为红、橙、黄、绿、青、蓝、紫七色光，如图 1-1 所示。

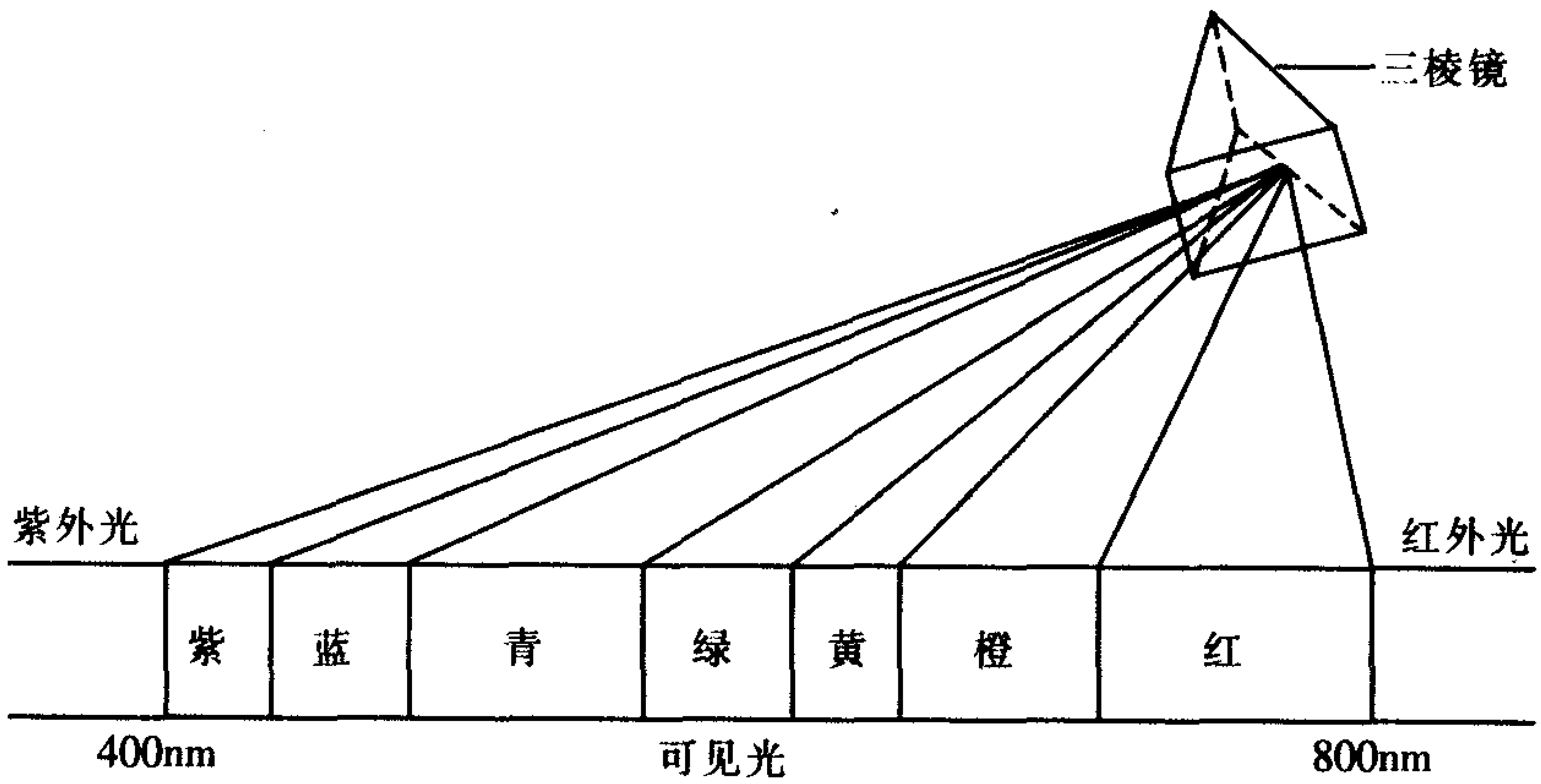


图 1-1 光的色散

其中红光的波长范围为 630～760nm；紫光的波长范围为 390～430nm。比紫光波长更短的光叫紫外线，比红光波长更长的光叫红外线，人的肉眼是看不到红外线和紫外线的。

在荧光显微镜和激光共聚焦显微镜技术中，常涉及到的是紫外光至可见光的光谱区域。在这两个区域内，光的波长与光的颜色关系如表 1-2 所示。

表 1-2 常用的光的波长与光的颜色关系

光谱区域	波长范围	光谱颜色
紫外光区	10～200nm（远紫外区） 200～390nm（近紫外区）	肉眼不可见波长小于390nm 的光
可见光区	390～430nm	紫
	430～450nm	蓝
	450～500nm	青
	500～570nm	绿
	570～600nm	黄
	600～630nm	橙
	630～760nm	红

注：不同资料上的数据略有差异

三、光的吸收

光进入某物质后，部分或全部的光能可被物质的分子或原子所吸收。物质从外部吸收能量后，进入激发态，当物质从激发态回到基态时，是以电磁辐射的形式放出所吸收的能量，这时便会发射出光。当有些物质由激发态回到基态时，不是以电磁辐射的形式，而是以其他形式（如以热能的形式）放出所吸收的能量，这时就不会发射出光。必须强调指出，光的吸收具有高度选择性，即一定能量的光量子辐射，只能被一定结构的物质分子或原子所吸收。例如，石英玻璃对可见光几乎不吸收，而对红外光有强烈的吸收作用。利用物质对光吸收的高度选择性制成的各种滤片，可以吸收一定波长范围的光，允许特定波长的光通过，因此可作为荧光显微镜中的激发滤片和阻断滤片。

第二章　荧光的基本知识

第一节　荧光的发光原理

一、荧　　光

在光的照射下，物质的电子吸收能量后，可由低能级的电子层（内层电子）跳到高能级的电子层。此时，电子由低能态进入高能态。高能态的电子是不稳定的，它会在极短的时间（10^{-8}s）内，以辐射光量子的形式释放能量后，再回到原来的能态。这时发射出的波长比激发光的波长要长，在可见光波长的范围内，为人眼所能看见的光，这种光称为荧光，如图 2-1 所示。

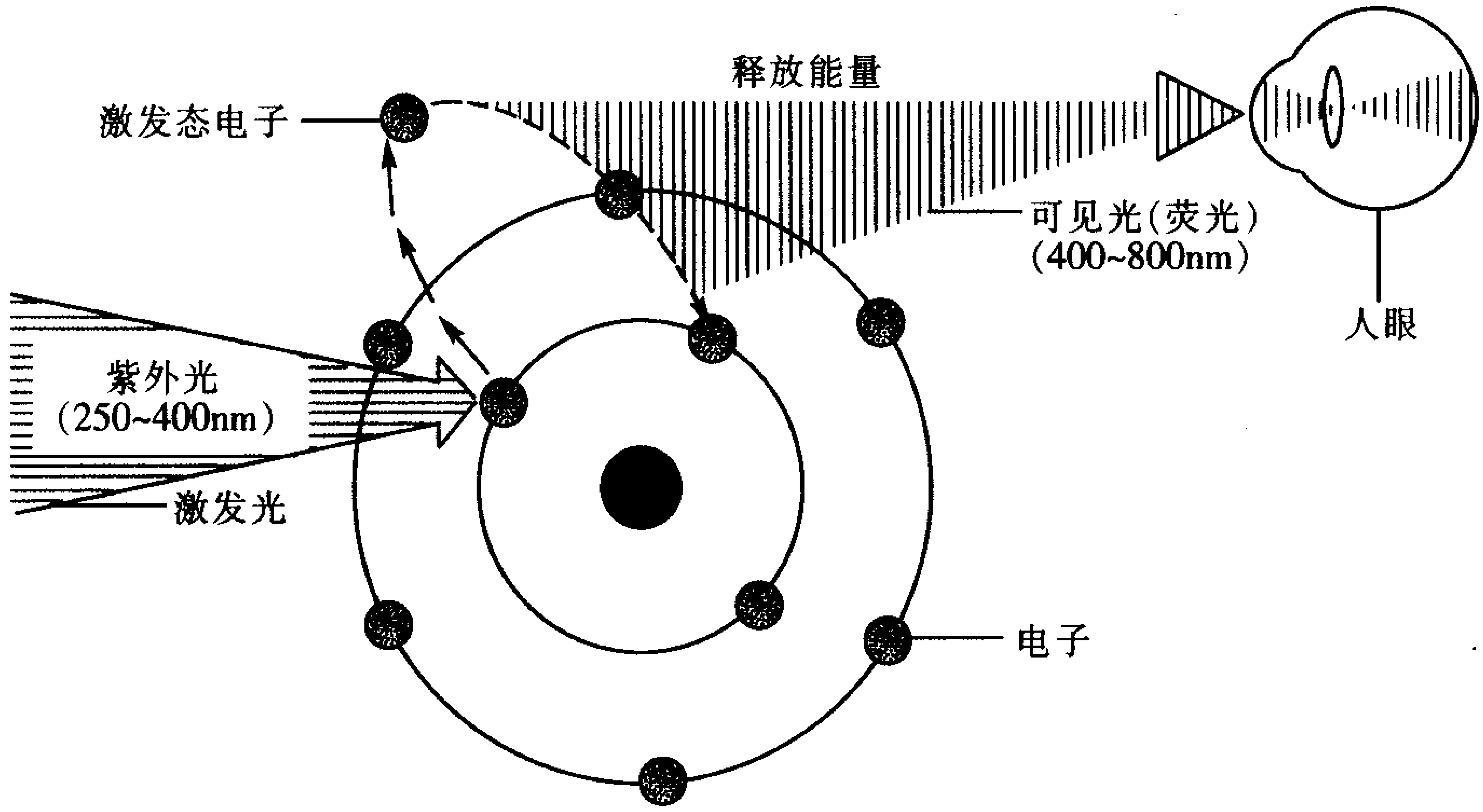
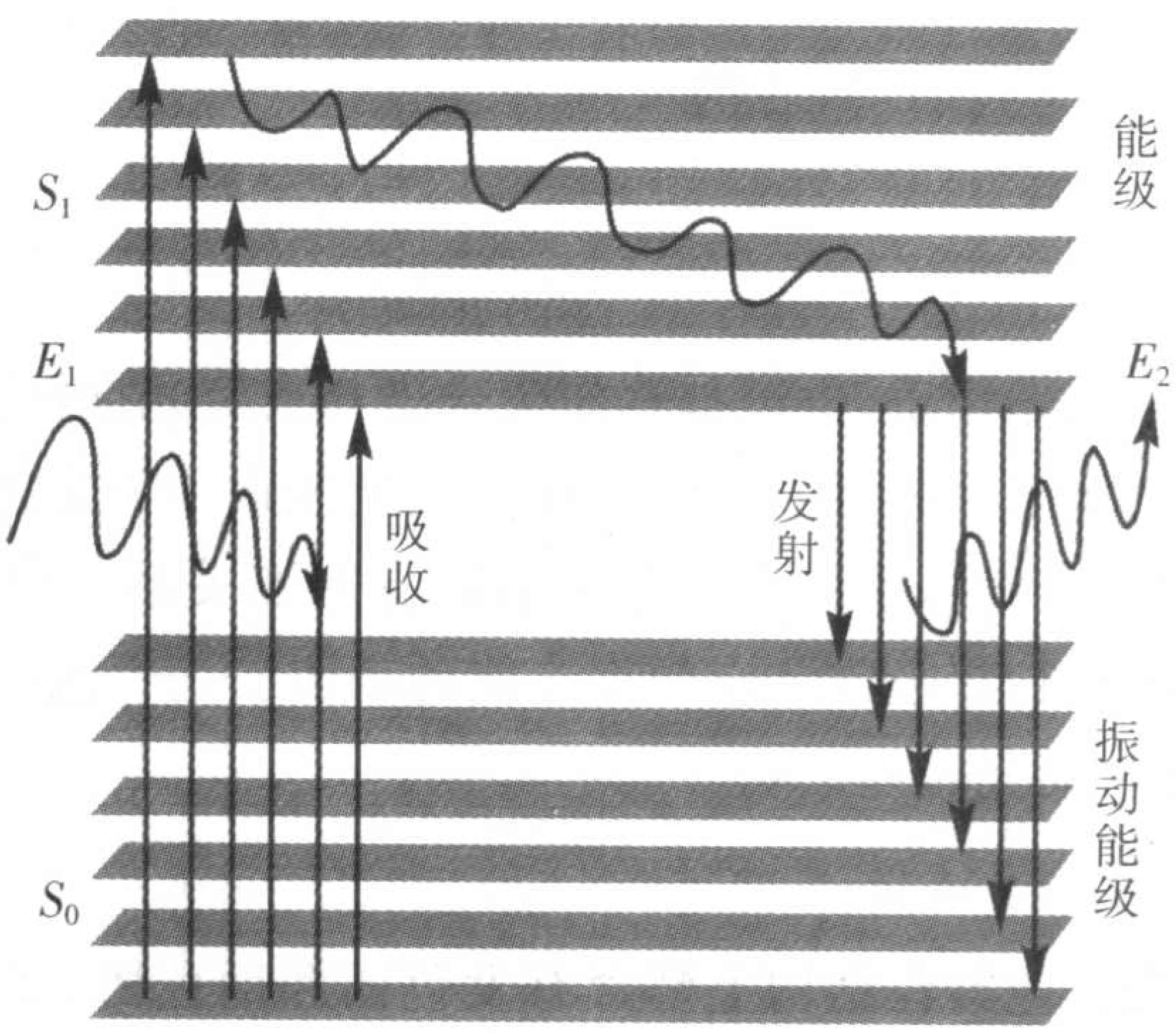


图 2-1　紫外光激发荧光物质发射荧光示意图

荧光是发光体分子中处于激发态的原子核外电子由高能级回到低能级所产生的辐射，因此是冷光。荧光的颜色多为蓝色、绿色、红色和黄色等。

二、荧光的发光原理

众所周知，物质的原子是由原子核和电子层所构成的。不同的原子含有不同数量的电子、电子层，电子是在不停地运动着的。根据量子理论，运动着的电子可以处于一系列不连续的能量状态（即能级）中，电子遵守一定的规则，可以从一个能级向另一个能级跃迁，并伴随着与能级差相对应的特定能量的吸收或释放。一般情况下，电子总是处于能量最低的能级（即基态）。在一定条件下，电子可吸收能量（如光能、热能、电能、机械能等）跃迁到较高能级（即激发态），这个过程叫激发。处于激发态的电子是不稳定的，它总是要跃迁回到基态，将多余的能量释放出去。跃迁方式可能是辐射跃迁，也可能是非辐射跃迁。以非辐射跃迁方式跃迁时，能量大多转化成热能，而以辐射方式跃迁时，能量转化成相应波长的光，这个过程叫发射，如图 2-2 所示。



S_0：基态　　S_1：较高的能级

E_1：激发能量　　E_2：发射能量

图 2-2　光能的吸收、转移和发射示意图

跃迁到激发态的电子，大多处于单重激发态。由于单重激发态很不稳定，半衰期很短，电子直接由单重激发态的最低振动能级下降到基态的任何振动能级，并以光的形式放出它们所吸收的能量，发射持续的时间也很短，这种发射光寿命较短，即为荧光。1838 年，Brewster 首先描述了这一荧光现象，但荧光一词，是由 Stokes 在 1852 年提出的。

处于激发态的分子量是不稳定的，它可能通过去活化过程丧失多余的能量而返回基态，丧失多余的能量的方式有：分子内的辐射跃迁和非辐射跃迁、分子间的相互作用。

由于只有一部分物质的分子能够发荧光。所以只有能产生荧光的物质才被称为

荧光物质。

荧光物质分子去活化回到基态的过程除了发荧光之外,还可能包括热能及磷光等释放能量的形式。因处于激发态的电子还可能先驰豫到三重激发态,再以辐射方式跃迁到基态,由于三重态的半衰期较长,发射持续时间也较长,这种发射光寿命较长,产生的是磷光。磷光也是一种辐射跃迁释放能量的形式,其通常要在低温或刚性介质中才能被观察到。

由光激发所引的荧光称为“光致荧光”;由化学反应所引起的荧光称为“化学荧光”;由X射线或阴极射线引起的荧光分别称为“X射线荧光”或“阴极射线荧光”;由激光引起的荧光称为“激光荧光”。如果化学发光在有生命的生物体中产出,例如:萤火虫(萤火虫的发光机制是体内的萤光素(luciferin)、萤光酵素(luciferase)、ATP及氧的化学反应而发光)和含磷的真菌,称为“生物发光”。无论哪一种荧光,其发光机制都是相同的。

三、荧光色素及其大分子结构

(一)荧光色素

荧光色素又称作荧光物质,也可被称作荧光染料或荧光探针。

能够产生荧光并能作为染料的化合物称为荧光色素。荧光色素对光的吸收和荧光的发射具有高度的选择性,这和它的分子结构有密切关系。产生荧光的最重要的条件是物质的分子必须具有吸收一定频率光能的基团——生色团(发射团)和能产生一定光量子的助色团(荧光团)。

(二)荧光色素的分子结构

荧光色素和非荧光色素在结构上都含有发色团和助色团,在单色光照射下都能吸收能量,但为什么只有荧光色素才发射荧光呢?这主要是与荧光色素的分子结构特征有关,同时也不是所有单色光都能激发荧光色素发射出荧光。荧光色素要发生荧光,物质分子必须具备合适的能量,此外这些物质还必须具有高荧光效率。荧光效率即荧光量子产率(YF),它可被定义为荧光物质吸收光后所发射出的荧光光量子数与所吸收激发光光量子数之比:

$$\text{荧光效率}=\frac{\text{发射荧光的光量子数}}{\text{吸收光的光量子数}}$$

荧光效率反映了物质将吸收的光能转化成为荧光的效率。荧光量子产率的数值越大,物质的荧光越强,用于荧光分析的荧光物质的量子产率要在0.35以上。那些不发光的物质,其荧光量子产率的数值为零。

由于处于激发态物质的分子可以由很多形式把激发光的光能释放出去,而发射光只是其中的一种形式。大部分物质没有发射荧光的性质,即使是荧光色素也不是

将吸收的全部光都转变为荧光，而是在发射荧光的同时，亦或多或少地以其他的形式释放其所吸收的光能。因此，在通常情况下，YF 的数值总是小于 1。如罗丹明 B 在乙醇中的荧光量子产率为 0.97，荧光黄在水中的荧光量子产率为 0.65。

许多吸光物质的荧光量子产率很低，不能产生荧光。因为这些物质吸收了激发光的能量后，再把这部分能量释放出来，大多用于同类分子或其他分子碰撞时的消耗，以热能的形式释放，因此无荧光发射。

有机化合物分子中具有 π 电子共轭结构者，其荧光效率随着 π 电子共轭程度的增加而增大，所发生的荧光光谱也将向长波长方向移动。任何有利于提高 π 电子共轭程度的结构改变，都能提高荧光效率或使荧光波长长移。荧光物质的分子结构，具有刚性结构和平面结构的 π-π 共轭体系。分子不会以 C-C 单键自由旋转(刚性)，π-π 共轭体系必须是共平面的，否则无法形成大的共轭体系。在共轭体系中使处于激发态的 π 电子有宽广的离域(π 电子的活动度)范围，使其在激发态时具有一定的稳定性，能够维持 10^{-8}s 左右，为使能量向荧光转化提供必要的时间。非荧光色素虽然也有 π-π 共轭体系，但不具备刚性结构和共平面的 π-π 共轭体系，因此不发光。

第二节　荧光色素的性质

一、激发光波长和发射光波长

通常使用荧光色素的激发光波长，大多处于近紫外区域或可见光区域，发射光波长多处于可见光区域。

物质发生电子从基态向激发态跃迁过程中吸收的能量，要高于荧光发射的能量，因此，荧光色素的发射波长总是大于其激发波长，两者的差值叫斯托克斯位移(Stokes shift)。斯托克斯位移说明了在激发与发射之间存在着能量损失。在荧光分析中，就是利用斯托克斯位移现象，将激发光与荧光物质的发射光分离出来，只检测发射光，从而可提高检测的灵敏度和选择性。

例：FITC(fluorescein isothiocynate，异硫氰酸荧光素)，它的激发光波长为 490nm。发射光波长为 525nm。斯托克斯位移是 525－490＝35(nm)，如图 2-3 所示。

有些荧光色素的斯托克斯位移较大，而有些荧光色素的斯托克斯位移较小。斯托克斯位移较大，其激发光谱和发射光谱的重叠就越少，有利于提高其分辨率。

根据荧光色素的激发光波长和发射光波长，可选择光源和滤光片。例如，如果荧光色素的激发波长处于紫外区，则必须使用紫外光源。

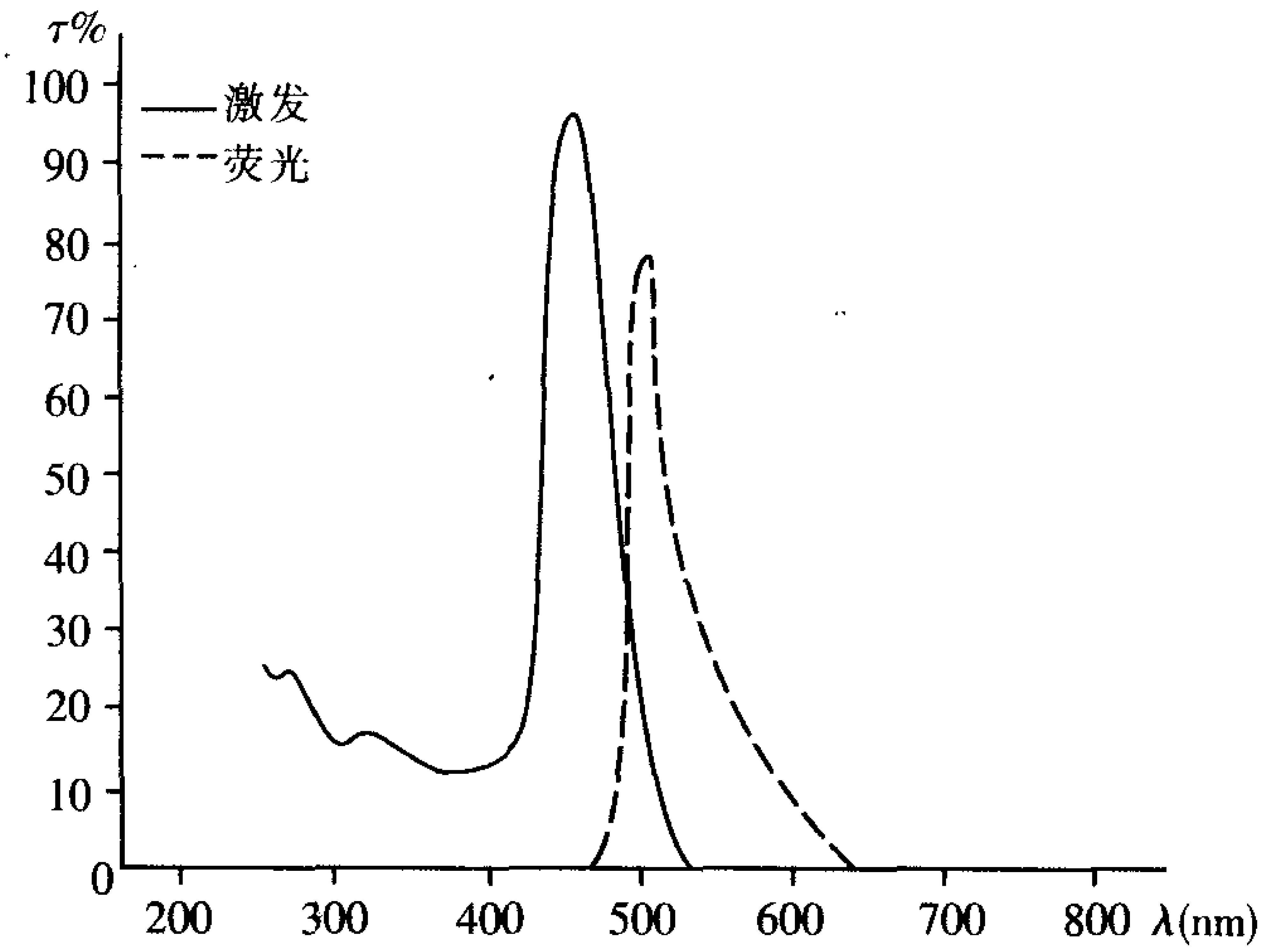


图 2-3 FITC 激发光谱和发射光谱

二、激发光谱和发射光谱

一般荧光物质都具有激发光谱和发射光谱，这两种光谱可以描绘出该物质的部分光学性质。

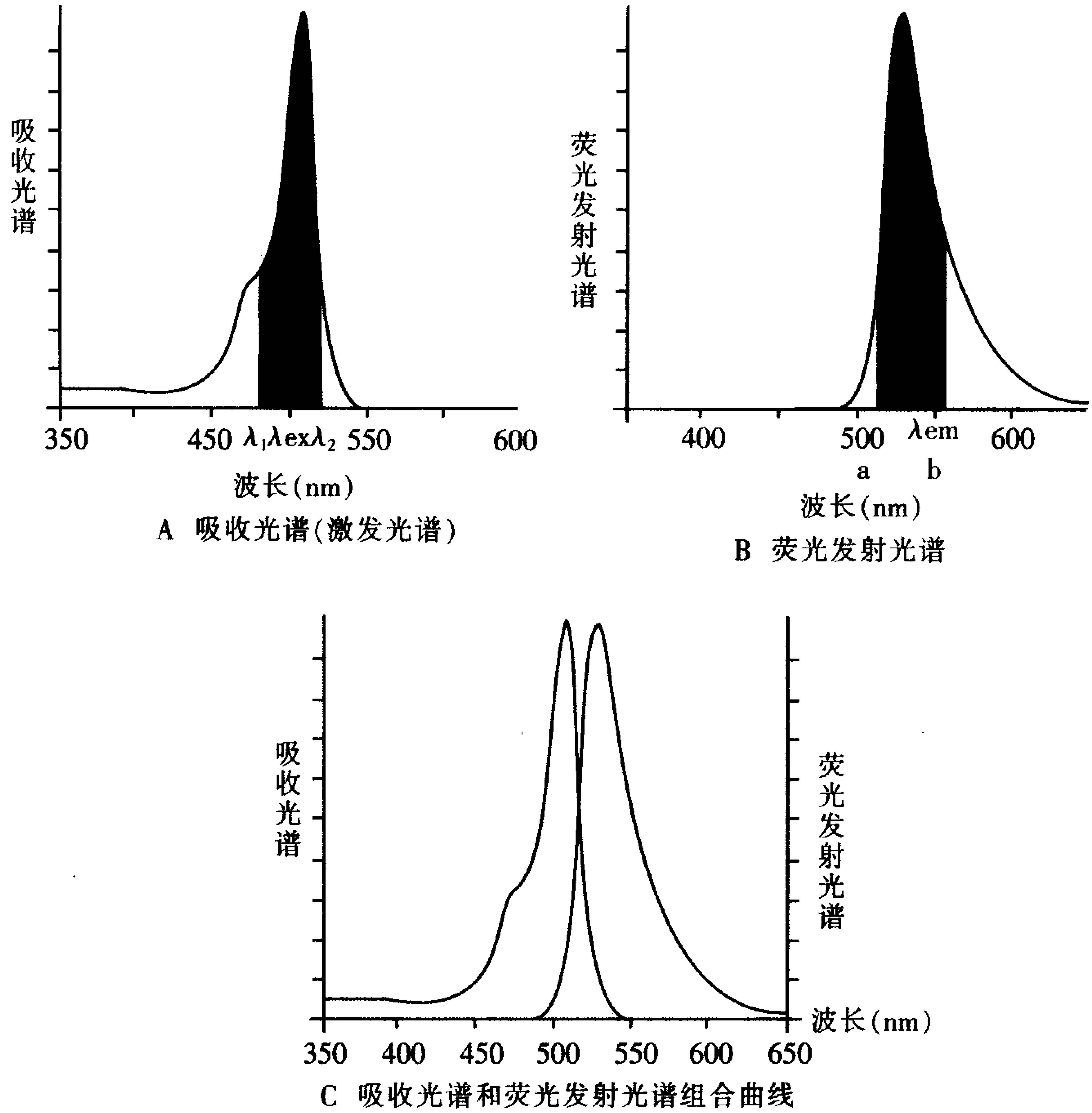
（一）激发光谱和发射光谱的基本概念

1. 激发光谱

激发光谱又称荧光激发光谱，是通过测量荧光物质的荧光发射强度随激发波长变化而获得的光谱。

激发光谱是将发射荧光单色器固定在某一波长的情况下，扫描激发单色器所测得的光谱。其具体测绘办法是：将发射荧光单色器的波长固定在待测荧光物质的最大荧光发射波长处，不断地改变激发光波长，以使不同波长的入射光激发荧光物质，所产生的荧光到达检测器，便可以测得该荧光的强度。以激发光的波长为横坐标，荧光强度为纵坐标作图，得到荧光强度与激发光波长的关系曲线，即为该荧光物质的激发光谱。

激发光谱显示出能量的有效吸收波长范围，并显示出荧光强度对激发光波长的依赖关系。所以激发光谱的实质是反映了不同波长激发光所激发出的荧光的相对效率。激发光谱经过校正后，在形态上与吸收光谱相同，这种情况下，可以用测定的吸收光谱代替激发光谱。一些荧光色素产品介绍中就只给出了荧光物质的吸收光谱，用户在选择激发光时从该谱线上可以查得其吸收峰值的波长范围作为参考。图 2-4 中 A为吸收光谱（激发光谱）示意图，横坐标表示激发光的波长，纵坐标表示每一个激发波长所对应的相对激发光强度。



A　吸收光谱(激发光谱)

B　荧光发射光谱

C　吸收光谱和荧光发射光谱组合曲线

图 2-4　吸收光谱和荧光发射光谱示意图

2. *发射光谱*

发射光谱又称荧光光谱，它是反映荧光物质的荧光发射强度与发射光波长之间相互关系的光谱谱线。荧光光谱是在固定激发光波长下扫描发射单色器所测得的光谱。其具体测绘办法是：保持激发光的波长和强度不变，而使荧光物质所产生的荧光通过不同波长的发射单色器后照射于检测器上，记录各种发射波长下相应的荧光强度。以荧光发射波长为横坐标，相应的荧光强度为纵坐标作图，便得到荧光发射光谱，如图 2-4 中 B 所示。荧光光谱表示在所发射的荧光中各种波长组分的相对强度。由于荧光发射发生于第一电子激发态的最低振动能级，而与荧光物质分子被激发至哪一个电子态无关，所以荧光光谱的形状通常与激发波长无关，只有极少数例外。

（二）激发光谱和发射光谱的用途

发光物质的光谱反映了分子、原子或离子的基态和激发态之间能量的跃迁。从基态到激发态的跃迁是由吸收光谱(激发光谱)所表征的，而激发态回到基态的反向

跃迁是由发射荧光光谱和发射磷光光谱所表征。荧光分析中，利用激发光谱选择灵敏的激发光波长，利用荧光光谱选择灵敏的检测波长。通常情况下要选择能够激发出最大荧光强度的激发光波长，在激发光谱(图 2-4 中 A)上可以看到某一激发波长 λex 下，具有最大发射荧光强度，则该激发光波长称为最大激发波长。在 λex 两侧，激发波长范围 $\lambda_1 \sim \lambda_2$ 所对应的是强发射荧光区域，即激发灵敏的区域。在荧光光谱(图 2-4 中 B)上，最大发射荧光强度所对应的波长 λem 称为最大发射荧光波长。而且在 λem 两侧 a～b 的波长范围内荧光发射强度较高。测定荧光时，激发波长在 λex、发射波长在 λem 时测定灵敏度最高。因此，激发光谱可以用来确定荧光探针适宜的激发波长，而荧光光谱则是确定荧光波长检测范围的依据。

激发光谱(或吸收光谱)及荧光光谱还可以用来鉴别荧光物质。这是因为在一定条件下，每一种荧光物质都有其特定的激发光谱及荧光光谱形状。一般在相同的测定条件下，荧光物质不同，其光谱也不相同。在鉴别荧光样品时，需要同时测定未知样品的光谱和已知物质(或标准物质)的光谱，并将二者的光谱相比较。

总之，在荧光分析中，激发光谱和发射光谱是选择和使用荧光色素(荧光探针)、鉴别不同荧光物质的依据。

每种荧光色素所吸收的光不仅有一定的波长，而且在各波长上的吸收量也不均匀，从而构成特殊的吸收光谱曲线。相应地，其发射荧光的情况也是如此。因此，一定的荧光染料在一定的条件下有一定的吸收光谱(激发光谱)和荧光光谱(发射光谱)(图 2-4 中 C)。荧光色素的吸收光谱和荧光光谱是符合 Stokes 定律的。例如吖啶橙的吸收光谱(最大吸收波长)是 455nm，其发射的荧光光谱是 450～700nm。因此，吖啶橙和细胞的不同成分结合后，可以发射蓝、绿、黄、橙、红各色荧光。也有部分荧光色素在紫外区带有 1～2 个吸收带，例如硫代黄素 T 的最大吸收波长是 380nm，它发射的荧光光谱在 420～500nm，它与细胞的不同成分结合后，可发生蓝、绿、黄、橙色等荧光。了解各种荧光色素的吸收光谱和发射光谱后，有利于我们在观察荧光样品时，有效地选择合适的滤片，以获取最好的荧光效果。

三、荧光强度

荧光强度即发射荧光的光量子数，荧光强度决定了荧光色素检测的灵敏度。它本身又取决于荧光色素的摩尔消光系数和荧光的量子产率，在确定的条件下，二者为定值。摩尔消光系数反映了荧光色素吸收激发光的能力，而量子产率反映了荧光色素将吸收的辐射能转化成荧光的效率。当荧光色素与细胞结构或生物分子结合时，其量子产率应接近或大于 0.4，否则没有实用价值。

四、荧光寿命

荧光寿命(即激发态寿命)，是指电子在激发态的平均停留时间。若电子受激后

迅速驰豫，则可实现多次激发，所以荧光寿命短时可提高灵敏度。大多数荧光色素的荧光寿命在纳秒级。特别长的荧光寿命对于高灵敏度检测也很有意义。例如，利用稀土离子配合物的长寿命荧光而建立的时间分辨荧光测量技术，可极大地提高检测的灵敏度。所谓时间分辨荧光测量技术，就是采用时间延迟技术，在激发后延迟一段时间等短寿命的散射光和自身本底荧光干扰信号衰减后，再测量荧光探针特异的荧光信号，这样可大大排除干扰信号，提高检测的特异性和灵敏度。

五、荧光稳定性

提高激发光的强度固然可以提高荧光的强度，但激发光的强度不是可以无限提高的。因为激发光的强度超过一定限度时，光吸收就趋于饱和，并不可逆地破坏激发态分子，这就是光漂白的现象。对于流式细胞术而言，光漂白的问题并不严重，因为光源照射细胞的时间很短；但对于荧光显微镜和激光共聚焦显微镜而言，光源需长时间照射样品，光漂白现象就会严重影响测量。解决光漂白问题最直接方法是降低光照的强度，或者是使用防淬灭剂。

六、荧光色素分子间的相互作用

大多数荧光色素都有浓度依赖式的自身荧光淬灭现象，即浓度高时荧光反而减弱。荧光淬灭，是指由于分子间的相互作用，降低了荧光量子产率而不改变荧光发射光谱的一种双分子作用过程。其机理可能是，激发态分子以非辐射方式将能量传递给邻近分子而不能发射荧光。

有些激发态分子还可相互作用形成激发态二聚体(excimers)，使发射光谱发生位移。这种性质可以运用于双波长发射比例测量。

七、荧光色素分子对环境的敏感性

荧光色素的荧光光谱和量子产率是受环境影响的，这也是许多荧光色素具有探针作用的基础。影响荧光色素的荧光性质的环境因素主要有：

(一) 荧光色素染液的 pH 值

荧光色素是否发射荧光，辐射何种荧光与它们在溶液中的存在状态有关，如1-萘酚-6-磺酸呈负一价离子时无荧光，呈负二价离子时才能发射蓝色荧光；α-萘胺呈分子状态时发射蓝色荧光，而呈一价离子时荧光消失。荧光色素中都含有酸性或碱性助色团，溶液的酸碱性对它们的电离有影响，如 1-萘酚-6-磺酸在 pH 6.4～7.4 的溶液中会发射蓝色荧光，当 pH 低于 6.4 时，就不发射荧光。不电离的荧光色素在各种 pH 溶液中都可发射荧光。pH 值可影响有机试剂的电离，也影响金属络合物的组

成，因此，pH 值对金属络合物的荧光影响大。

（二）温度

荧光色素的荧光量子产率和荧光强度通常随溶液温度的降低而增加，如荧光黄的乙醇溶液在 0℃以下，每降低 10℃，荧光量子产率增加 3%，降至 −80℃时，荧光量子产率接近 100%；反之则减弱。温度升高，分子热运动加大，分子碰撞几率增加，使处于激发态的 π 电子难以维持稳定，导致荧光的淬灭。一般在 20℃时，温度引起的荧光淬灭作用就有表现，随着温度的升高，淬灭作用加剧。在 20℃以下荧光量子产率随温度变化不太明显，因此进行荧光染色过程中，为获取良好的染色效果，要注意温度的控制。

（三）光分解作用

当激发光源能量过大时，可使荧光色素分子中的共价键发生断裂，分子结构破坏，将使激发能大部分消耗，因此无荧光发射。故在实际应用中，在满足镜下观察的最高灵敏度条件下，应选择适当的激发光强度（功率）。

（四）溶剂性质对荧光色素的影响

溶剂的性质对荧光色素的荧光强度有明显影响。同种荧光色素在不同的溶剂中，其荧光光谱的位置和强度都有差别，一般是荧光峰的波长随着溶剂的介电常数增大而增大。如 8-羟基喹啉在乙腈、丙酮、氯仿中的荧光量子产率随着溶剂极性的降低（介电常数降低）而依次递减。如果溶剂和荧光色素形成了化合物或溶剂使荧光色素的电离状态改变，则荧光峰的波长和强度都会发生很大变化。如在苯胺或萘胺的稀溶液中加入少许盐酸，由于形成盐酸盐，其荧光将会消失。

（五）荧光色素浓度的影响

浓度对荧光强度的影响更明显。在稀溶液中的荧光强度与荧光色素的浓度呈线性关系；浓度增加到一定程度时，荧光强度保持恒定，即使再增加浓度，荧光强度也不发生变化；若浓度继续增加，超过一定限度后，荧光强度将随着浓度的增加而减弱。荧光色素染色的应用浓度一般为 10^{-3} ～ 10^{-5} mol/L。

（六）荧光色素和其他生物分子结合的影响

有些荧光色素结合到生物分子上后，荧光比原来在水溶液中明显增强。

八、荧光色素的分类

荧光色素可被紫外光或蓝紫光（短波长光）激发而发射荧光，现在应用的一些荧光色素也可被长波长光线激发。这类荧光色素大多数属于吖啶类，如吖啶橙、吖啶黄、罗丹明、荧光黄钠等。按其化学反应性可将荧光色素分为三类：

碱性荧光色素：含碱性助色团，在酸性溶液中电离，荧光色素离子为阳离子。吖啶类荧光色素如吖啶黄能与 DNA 和 RNA 结合而染色。主要是通过嵌入 DNA 的

双螺旋结构实现的。溴化乙啶也是通过嵌入 DNA 而染色，在紫外光照射下发红色荧光。

酸性荧光色素：含酸性助色团，在碱性溶液中电离，荧光色素离子为阴离子。

中性荧光色素：由酸性荧光色素和碱性荧光色素混合而成的一种复合染料。

第三节　组织细胞的自发荧光与继发荧光

组织细胞的荧光有两种：一种是自发荧光，一种是继发荧光。

一、组织细胞的自发荧光

组织不经荧光色素染色，在紫外光或短光波的照射下所呈现的荧光叫自发性荧光。

自发荧光的生物体存在于地球上的主要生存环境中，如：土壤（细菌）、洞穴（新西兰萤火虫）、空气（萤火虫）、植物（真菌）、岩石（穿石贝）、海洋（水母）等。在生物分类中有 16 个门的 700 余种生物具有自然发光现象。其中包括众所周知的种类，如蘑菇、水母、鱿鱼、海星、软体虫、鱼和甲虫，但其他一些熟悉的种类，如蜘蛛、蟹、两栖动物以及哺乳动物等则不具发光特性。生物发光在海洋中尤为普遍。在弱光地带，海平面 900 米以下几乎所有动物都能发光，其发光颜色各异，从 Seavsiid 鱼的深蓝光、水母的蓝绿光、某些真菌的绿光，到萤火虫的黄光和橘黄光。发红光的生物非常罕见，但深海鱼 Malacosfeus 却有两对发射红光的器官和两个发射蓝光的器官。同样，南美花科雌甲虫 Phrixothir 的头上也有一对红色器官，其身体上还有 11 个黄绿色器官。

哺乳动物不发光，但其体内存在着能产生超微弱化学发光的细胞，这种光肉眼不可见，但可用光电倍增管检测到。在肺脏、肝脏、离体的细胞，如吞噬细胞、血小板、受精卵、真菌、酵母和植物中，甚至在人的呼吸气流中，均可见到这种超微弱化学发光。其原因是氧代谢物的生成和内源性物质如不饱和脂肪酸的氧化，还可能是具有自身化学发光的单态氧的形成。

这样，从化学发光的四种类型（合成发光、生物发光、超微弱发光以及能量传递发光）中，建立了生物反应和生物物质的检测方法。

1652 年，Olaus Maynrs 主教曾报道：在北极，当人们急需在夜间行路时，就用一种简便的方法——放置一些腐烂的橡树枝，以照亮森林中的道路。可以推断，这是腐烂橡树枝上真菌所发的光。那时人们就已发现不需燃烧明火就能照明的方法。

近年来人们又发现，化学发光与生物发光最为有用的应用之一就是既能使活细胞内的分子信号和基因表达发光，又不损伤细胞。

化学和生物发光是有趣的自然现象，它使人们的研究从深海和岩石的生态学和生物学领域，通过生物化学、化学达到了自然光本身，或许能将它们更好的应用于人类生命。

（一）动物组织细胞的自发性荧光

一般组织细胞中的蛋白质和脂类在紫外光照射下能发出微弱的淡蓝色的荧光，其中弹性纤维的荧光很强，呈亮蓝色。

Dempsey(1943)观察了甲醛固定的卵巢切片，证明结缔组织和黄体细胞为淡蓝色荧光，而卵泡的荧光较暗，成熟卵泡膜细胞呈黄绿色荧光，这种黄绿色荧光可能与卵巢激素有关。

Eranko(1955)观察了经甲醛固定的田鼠、猫、大白鼠、小白鼠的肾上腺，证明肾上腺髓质内有两种不同的嗜铬细胞：一种细胞经紫外光照射后呈现很强的自发性荧光，这种细胞成群分布；另一种细胞的荧光很弱。用碘化钾处理标本时，强荧光的细胞群选择性地浸染成棕色，而弱荧光的细胞无色。Eranko 认为发强荧光的细胞群含有并分泌去甲肾上腺素，而其他细胞含有并分泌肾上腺素。

细胞内的脂褐素呈棕黄色的自发荧光。例如，心肌细胞核两侧的肌浆内随着年龄的增加或在某些疾病的情况下，可见较大量的棕黄色的脂褐素荧光颗粒。

细胞内脂褐素各界值是细胞老化的一个公认指标，对于用神经母细胞瘤细胞在无血清培养下建立的神经细胞老化模型。利用紫外光激发脂褐素能产生自发荧光，并且其荧光值与脂褐素值具有相对应的特点，可测定体外培养一定时期的细胞内脂褐素的自发荧光值，从而观察测试对象对脂褐素积累的影响。

维生素 A 呈绿色自发性荧光。Popper 观察了大白鼠器官内维生素 A 的分布(1940～1941)。大白鼠食入维生素 A 以后，在很多器官的细胞内，如肝细胞、库普弗细胞、肾上腺束状带细胞、肺和肾的间质细胞、卵巢间质细胞和黄体细胞、眼球视网膜细胞、脂肪细胞及小肠细胞内均可见到维生素 A 的绿色荧光，并证明缺乏维生素 A 的动物的绿色荧光将会消失。患维生素 A 过多症的大白鼠肝细胞内呈现明显的绿色荧光，库普弗细胞增大并含有大量维生素 A。

此外，某些药物可呈现一定的荧光，四环素为黄色荧光，四环素能和骨基质中的钙结合，利用这一特性，可以用四环素饲养动物以观察新骨质的形成，这在活体内骨组织计量学研究和临床检验中得到了广泛应用。Vassar 等(1960)证明，四环素和癌细胞有较大的亲和力，能在恶性肿瘤内形成亮黄色的荧光灶。阿的平和奎纳克林发黄绿色荧光，它曾被用于研究药物在蠕虫体内的分布，阐明药物对蠕虫的作用。

Falck 和 Hillarp 等(1962)报道了多聚甲醛可以诱发组织细胞内的内源性生物胺。Dahlstrom 等(1964)用这种方法证明了哺乳动物脑干中存在两种单胺神经元——儿茶酚胺型(catecholamine)神经元和 5-羟色胺型(5-hydroxytryptamine)神经元。前者含有去甲肾上腺素或多巴(Dopa)。用多聚甲醛处理后，前者呈现黄绿色荧光，5-羟色胺呈黄色荧光。并且，他们对两种单胺神经元在脑干中的分布进行了详

细观察。同时,很多学者证明了血小板、松果体中的神经元、消化道黏膜内的嗜铬细胞以及某些动物结缔组织中的肥大细胞内均含有黄色荧光的5-羟色胺。

显示脑干单胺神经元的荧光方法:Wafson(1976)报道用0.1mol磷酸缓冲液(pH 7.0)配制的4%多聚甲醛冷溶液灌流动物,恒冷箱冰冻切片,真空干燥后,在80℃与多聚甲醛蒸气作用1h,可显示中枢神经系统细胞内的单胺成分。整个过程只需4~5h。

（二）植物细胞的自发荧光

植物在紫外光照射下能发出弱的淡蓝色、淡绿色和红色的荧光。

(1) 细胞壁的自发荧光:植物的细胞壁可自发出淡绿色荧光(约为540nm),产生荧光的原因还不是很清楚,但其自发绿色荧光的物质基础是与细胞壁多糖结合的酚酸。

(2) 叶绿体的自发荧光:叶绿体在光合作用中吸收可见光(叶绿素b在430、454、595和643nm处有吸收峰)已是人所共知的,但叶绿体能自发荧光却并不完全为人所知。当激发光波长为337.1nm时,叶绿体的发射波长为405nm,呈蓝色;当激发光波长在541~570nm时,叶绿体的发射波长为570~595nm、670nm,呈橙红色。因此在实验中应注意选择合适的激发光波长。

叶绿体分子含有一个卟啉环的"头部"和一个叶绿醇(植醇,phytol)的"尾巴"。卟啉环由四个吡咯环以四个甲烯基(—CH=)连接而成。镁原子居于卟啉环的中央,偏向于带正电荷,与其相连的氮原子则偏向于带负电荷,因而卟啉具有极性,是亲水的,可以与蛋白质结合。另外还有一个含羰基和羧基的同素环,羧基以酯键和甲醇结合。环上的丙酸基侧链以酯键与叶醇相结合。叶醇是由四个异戊二烯单位组成的双萜,是一个亲脂的脂肪链,它决定了叶绿体的脂溶性。卟啉环上的共轭双键和中央镁原子易被光激发而引起电子得失,从而使叶绿体具有特殊的光化学性质。以氢的同位素氘或氚试验证明,叶绿体不参与氢的传递或氢的氧化还原,而仅以电子传递(即电子得失引起的氧化还原)及共轭传递(直接能量传递)的方式参与能量的传递。

(3) 植物的抑菌物质(抵御病虫害)多是芳香化合物,在紫外光激发下发射荧光。

二、组织细胞的继发荧光

组织细胞经荧光色素染色后,细胞内某些成分和荧光色素结合后而呈现的荧光称为继发性荧光。荧光色素和细胞内的某种特定成分结合后可以呈现出不同颜色的专一性荧光。利用某些成分的继发性荧光,可对各种组织进行细胞化学的观察和研究。组织细胞的继发荧光在生命科学研究中的应用十分广泛,详细内容见本书第二部分的第七章、第八章、第九章、第十章和第十二章。

第四节 荧光的淬灭及抗淬灭

一、荧光的淬灭

荧光物质的分子从第一激发单重态向基态跃迁是一种释放能量的过程，其能量的释放有荧光发射(辐射跃迁)和非荧光两种形式。前者是进行荧光分析所必需的；后者与荧光发射形式竞争能量，会导致原来能够发荧光的物质分子不能发出荧光，这种现象即为荧光淬灭现象。

荧光分子的荧光淬灭是由内部因素和外部因素同时作用造成的。内部因素主要是分子从激发态回到基态以非辐射跃迁形式释放能量；而外部因素则包含有多方面，常见的作用因素有：

(1) 光照射。它是导致荧光淬灭的最常见的因素，荧光的产生需要光照射，但同时光照射也会促进激发态分子与其他分子相互作用而引起碰撞淬灭。

(2) 荧光物质的分子与外部分子(或离子)形成非荧光的络合物。

(3) 共振能量的转移。

(4) 溶剂种类、pH 值。

(5) 温度。

能够引起荧光淬灭的物质称淬灭剂，如卤素离子、重金属离子(配位数较大的金属离子)、具有氧化性的有机化合物(硝基化合物、重氮化合物、羰基化合物、羟基化合物)和氧分子。

外源性的淬灭剂如氧分子，以浓度依赖的方式淬灭染料的荧光。通常情况下，淬灭是由于碰撞引起的，这时通过研究淬灭剂对染料荧光的淬灭作用，可获得淬灭剂与荧光基团的亲和性及其扩散速率的信息。蛋白质也可淬灭许多荧光团的荧光，例如荧光素或 NBD 的抗体是各自有效而特异的荧光淬灭剂。荧光探针的浓度大于 1g/L 时，常发生荧光的自灭现象，这是由于被激发的分子在发生荧光前和未激发的分子碰撞或由于荧光探针分子间缔合而形成二聚体或多聚体的关系。

氢离子探针，如 BCECF 和 SNAFL 等，其激发或发射光谱对 pH 值很敏感，可用于监测 pH 值。但有时又要求染料对 pH 值不敏感，则可选用对 pH 值不敏感的染料，如 BODIPY 类染料。

考虑到以上因素，在进行荧光探针实验时除注意合适的 pH 值、溶剂、温度等条件外，染色溶液最好新鲜配制，配高浓度的储存液，在临用前稀释，避免因储存时间过长而失效。另外，利用染料对环境的敏感性可以设计所需要的探针。例如，在对 pH 敏感的荧光素的 6′-羟基上连上半乳糖，得到的二半乳糖苷荧光素(FDG)就是检测

β-半乳糖苷酶活性的特异性探针，因为 FDG 的荧光很弱，而经过 β-半乳糖苷酶的作用后生成的荧光素具有很强的荧光。

图 2-5 是激光照射下荧光淬灭曲线。从图中可以看出，随着激光照射时间的增加，荧光淬灭的速度是非常快的。在最初的 20s 内几乎呈直线下降。

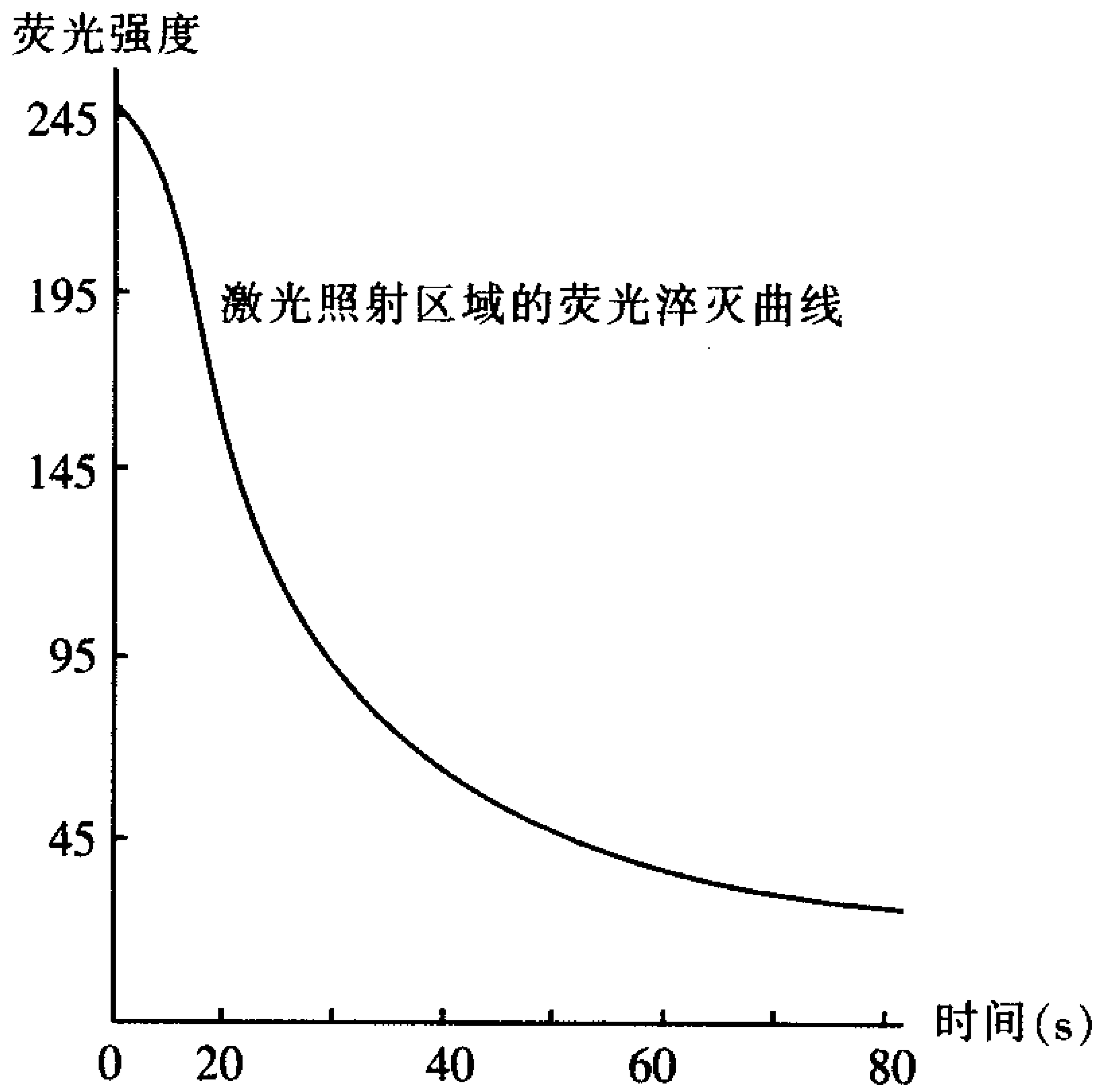


图 2-5　激光照射下荧光淬灭曲线

二、荧光的抗淬灭

在进行荧光探针的荧光标记后，常存在各种因素导致荧光淬灭或衰减。标记样品的荧光褪色/漂白是在荧光显微镜、激光共聚焦显微镜观察时遇到的主要问题。激光扫描共聚集显微镜由于具有更强的功率和聚焦更准确的光束，与普通荧光显微镜相比，标本的光漂白作用更为明显，荧光团的荧光可在连续的观察过程中逐渐减弱或消失。因此，应考虑使用抗荧光淬灭剂(抗荧光衰减剂)。抗荧光淬灭剂的应用可减慢荧光衰减的过程，获得更长的观察时间进行荧光测定术(或荧光定量分析)和模式识别(pattern recognition)。许多因素对荧光强度和荧光团的光漂白有影响，如激发光的强度(功率)、pH 值、溶液的性质，以及存在其他使荧光淬灭的物质等。根据已经提出的几种光漂白的假说，包括氧自由基的损伤作用和蛋白变性，在进行荧光探针的荧光标记后，常存在各种因素导致荧光淬灭或衰减，因此在许多情况下应考虑使用抗荧光衰减剂。现已有不少公司推出了一些有效的荧光保护剂，可以延缓荧光淬灭的时间。一些常用的和最有效的抗荧光衰减剂的优缺点比较如下：

（一）常用的抗荧光淬灭剂

1. p-苯二胺(phenylene diamine,PPD)

PPD虽然是最有效的抗淬灭剂之一，但对光和热都有较强的敏感性，而且具有毒性，因此限制了其在体内研究中的应用。较理想的PPD抗淬灭剂混合液配方是：90%甘油、10%PBS，其中PPD浓度在2～7mmol/L之间，最终pH值为8.5～9.0。

2. n-丙基没食子酸盐(propyl gallate,NPG)

NPG无毒性，对光和热稳定，但抗荧光漂白的效果不如PPD，可用于体内研究。推荐浓度在3～9mmol/L，用甘油配制效果也不错。

3. 1,4-二偶氮双环[2,2,2]-辛烷(1,4-diazobicyclo[2,2,2]-octane,DABCO)

DABCO是一种非离子性、稳定性的抗淬灭剂，价格便宜而且容易使用，可用于体内研究。

另外，维生素C也有一定的抗荧光漂白作用。

（二）抗荧光淬灭试剂盒

经过不可逆的光漂白过程可导致荧光强度的显著降低或消失，将明显降低检测的灵敏度，尤其在目标分子的含量相对较低、激发光较强或持续检测时间较长的情况下更为明显。为减少荧光样本的光漂白作用，分子探针公司专门生产了几种抗荧光淬灭试剂盒：ProLong、SlowFade和SlowFade Light，已经证明它们可增强许多用于固定细胞和组织以及游离细胞标本的荧光探针的光稳定性。抗淬灭剂的主要功能是保持荧光探针的荧光强度，通常是通过抑制活性氧基的产生和释放而发挥作用的。常用试剂盒简介如下：

1. ProLong抗淬灭试剂盒

ProLong抗淬灭试剂盒的组成部分包括：

(1) ProLong抗淬灭剂粉末；

(2) ProLong封片剂；

(3) 标本封片过程的实验步骤。

使用该试剂封片，可使大多数荧光探针的荧光淬灭减弱或不发生荧光淬灭。牛肺动脉内皮细胞(BPAE)用荧光黄次毒覃环肽标记，用PBS作为封片剂30s后，光漂白使荧光强度下降约为初始荧光强度的12%，而使用该试剂盒封片在同样条件下则保持不变。在用荧光黄标记Hep-2细胞时，采用该试剂封片比采用含有p-苯二胺的试剂封片得到的荧光强度更强。在Texas Red染色时，采用该试剂可显著增强其荧光强度。该试剂也可有效抑制以下荧光探针的淬灭：四甲基罗丹明(tetramethylrhodamine)、DNA-结合的核酸探针，如DAPI及碘化丙锭(propidium iodide)和YOYO-1。由于其适用范围较广，而且对多数荧光探针都具有抗光漂白作用，因此是进行荧光多标记的常用试剂，常应用于多种标记的荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)。

2. SlowFade 和 SlowFade Light 抗淬灭试剂盒

该试剂原始配方可将荧光黄的荧光淬灭速率减小到零，尤其适用于激光扫描共聚焦显微镜的定量测定，因为其在进行测定时往往要求激发强度相对较强，而且采集时间也较长，容易造成荧光淬灭。SlowFade 试剂可使荧光黄的有效荧光发射扩大 50 倍以上，用该试剂封片后，细胞和组织中的荧光信号可保持两年之久。原始的 SlowFade配方实际上可使荧光黄的荧光完全淬灭，几乎也可使小瀑布蓝(Cascade Blue)和 Alexa Fluor 350 荧光团的荧光几乎完全淬灭。为克服这种局限，分子探针公司的研究人员又研制了 SlowFade Light 抗淬灭试剂盒。该衰减剂的配方使荧光黄的荧光衰减速率降低 5 倍，而荧光黄的初始荧光强度没有显著降低，因此使光学显微镜的信噪比显著提高。此外小瀑布蓝、Alexa Fluor 350、Texas Red 的淬灭也达到最小。实际上，SlowFade Light 抗淬灭试剂盒可将小瀑布蓝的衰减速率几乎降到零，而其发射强度仅降低约 30%。每一种 SlowFade 或 SlowFade Light 抗淬灭剂试盒的组成包括：

(1) SlowFade 或 SlowFade Light 抗淬灭剂，储存于甘油中，即用型，足够封片 200 张；

(2) 2×浓缩的 SlowFade 或 SlowFade Light 抗淬灭剂溶液，用于那些不适合用甘油作为封片液的实验中；

(3) 平衡缓冲液，可提高样品的 pH 值，增加两种抗淬灭剂配方的保护作用；

(4) 详细的标本封片步骤说明。

另外，还有用于蓝色核衬染荧光探针 DAPI 的 SlowFade 和 SlowFade Light 抗衰减试剂盒，加入该试剂有防止光漂白的作用。SlowFade 试剂盒与 ProLong 试剂盒不同，使用时不需要混合，将荧光标记的标本用该试剂盒提供的平衡缓冲液简单洗涤后，即可将封片剂直接加在玻片上封片。分子探针公司提供的抗淬灭剂对各种荧光探针的抗淬灭作用如表 2-1 所示。

表 2-1　抗淬灭剂对不同荧光探针的抗淬灭作用

荧光团	无抗淬灭剂	SlowFade 抗淬灭剂		SlowFade Light 抗淬灭剂		ProLong 抗淬灭剂	
	抗光漂白作用*	抗光漂白作用*	初始荧光强度	抗光漂白作用*	初始荧光强度	抗光漂白作用*	初始荧光强度
Alexa Fluor 488	++	++	++	++	+++	+++	+++
Alexa Fluor 532	++	+	+++	+	++	+++	+++
Alexa Fluor 546	+++	++	+++	+	+++	++	++
Alexa Fluor 568	++	+	+++	+	+	+++	+++
Alexa Fluor 594	++	++	+++	++	+++	+++	+++
Alexa Fluor 633	+++	+++	+	+++	+++	+++	++
Alexa Fluor 647	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Alexa Fluor 660	+	+	+++	+	+++	+++	+++
Alexa Fluor 680	+	+	++	+	++	+++	++

续表

荧光团	无抗淬灭剂	SlowFade 抗淬灭剂		SlowFade Light 抗淬灭剂		ProLong 抗淬灭剂	
	抗光漂白作用 *	抗光漂白作用 *	初始荧光强度	抗光漂白作用 *	初始荧光强度	抗光漂白作用 *	初始荧光强度
AMCA	++	+++	++	++	+++	ND	ND
BODIPY FL	+	+++	+	+	++	+	++
Cascade Blue	+	+++	++	+++	+++	ND	ND
Cy3	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
DAPI	++	++	+	++	+	+++	++
Fluorescein	+	+++	++	+	++	+++	+++
Marina Blue	+	ND	ND	ND	ND	+++	+++
Oregon Green 488	+	+++	+	++	++	+++	+++
Oregon Green 514	++	+++	+	++	++	++	++
Propidium iodide	+	++	++	++	+	+++	+++
SYTOX Green	+	++	++	+	+	+++	+++
Tetramethylrhodamine	++	++	++	++	++	+++	+++
Texas Red	+	+	++	+	++	+++	+++
YOYO-1	++	++	+++	+++	+	+++	+++

注：*(+++)：荧光团对光漂白有很好的抵抗作用；*(++)：荧光团对光漂白有一定程度的抵抗作用；*(+)：荧光团对光漂白没有或仅有极弱的抵抗作用。(+++)：抗淬灭剂引起初始荧光强度极少或没有降低；(++)：抗淬灭剂导致初始荧光强度一定程度的降低；(+)：抗淬灭剂导致初始荧光强度显著降低。ND：未确定。数据是根据毛细管中的荧光探针溶液测得

三、其他抗荧光淬灭方法

采取以下措施，可使活性细胞或非活性标本的荧光强度得到增强：

(1) 使用中密度滤片；

(2) 采用高数值孔径的物镜；

(3) 相对较低的放大倍数；

(4) 高质量光学滤片和高速胶片；

(5) 高效能检测器。

第五节　荧光光谱交叉干扰及消除

在使用两种以上荧光探针时，如果两个荧光发射峰很近，荧光光谱彼此会有部分重叠，这种现象称为荧光光谱交叉(crosstalk)。当这种荧光光谱交叉严重时，便会出

现一种荧光探针的荧光信号扩散到另一荧光探针的检测通道的情况，造成光谱交叉干扰。图 2-6 是 Hoechst33258(HO33258)、FITC 和 tetramethylrhodamina(TMR)的荧光发射光谱。其中 HO33258(蓝)与 FITC(绿)之间的光谱谱线有部分重叠，当同时用 364nm 和 488nm 激光扫描两荧光物质时，在 FITC 的发射荧光峰值波长 525nm 处就会检测到 HO33258 的发射荧光。当在大于 510nm 波长范围内检测 FITC 的荧光时，HO33258 在该部分的荧光(图 2-6 中阴影部分)会干扰 FITC 的荧光测定。

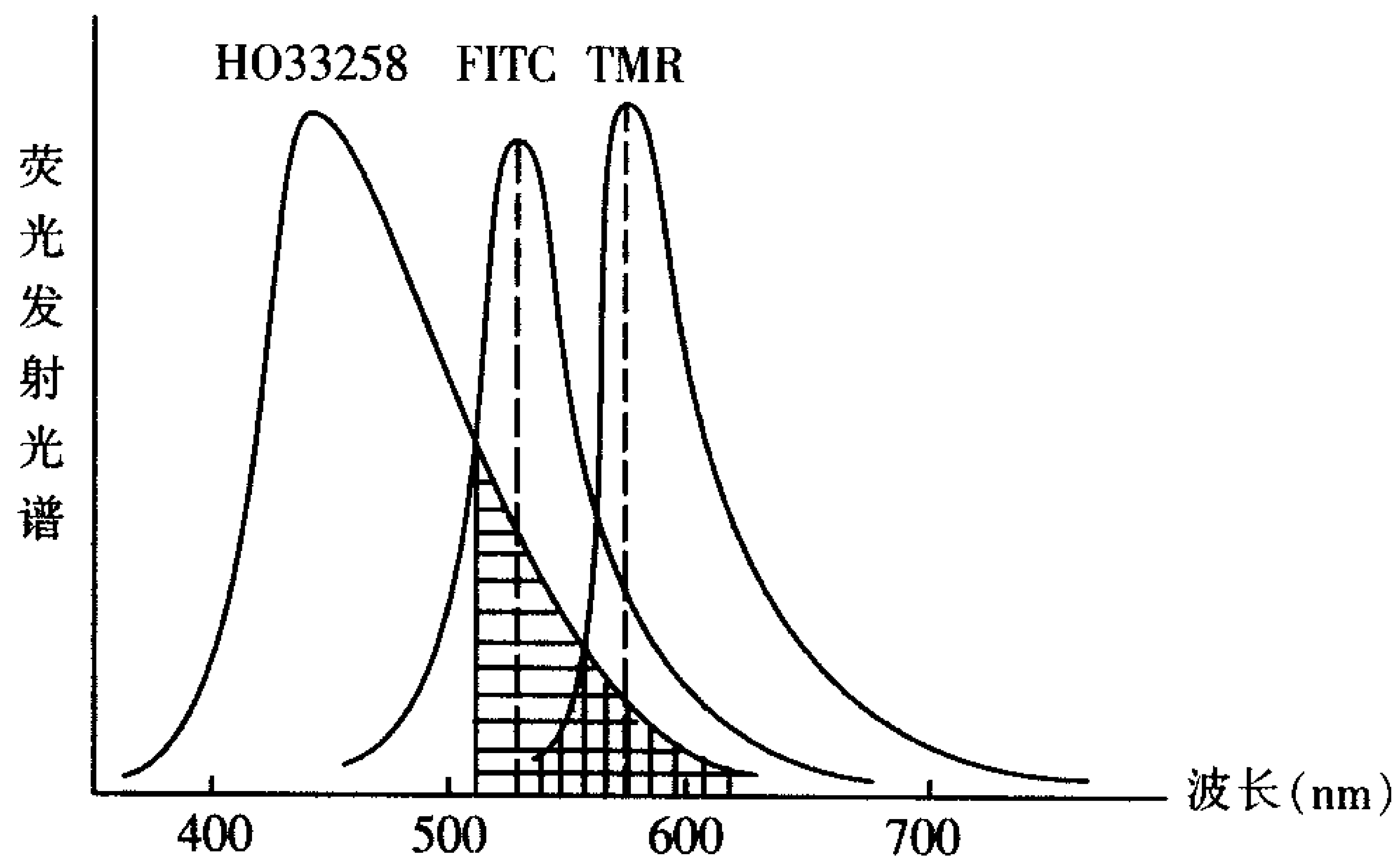


图 2-6　HO33258、FITC 和 TMR 的荧光发射光谱发生光谱交叉示意图

光谱交叉现象经常存在于多重标记的样品之间，这一点可以从发射光谱上看出。图 2-6 显示的不仅是在 HO33258 与 FITC 之间，在 FITC 与 TMR 之间的荧光发射光谱也存在着光谱交叉。当测定用这些荧光探针标记的样品时，要注意消除光谱交叉干扰。

虽然几种荧光化合物共存于同一样品中，但是每一种荧光化合物都有其自身的激发光谱和发射光谱，而且不同的荧光物质的这两种光谱往往会存在差异，表现在光谱的形状不同、激发峰和发射峰的峰宽范围、最大峰值波长和强度不同，所以在测定时可以根据仪器条件选择激发波长、发射波长和其他参数差异比较大的荧光探针标记样品，可以减少或避免荧光物质间的干扰。即在选择同时使用的几种荧光探针时，一般选择发射光谱没有交叉或交叉小、发射峰值波长不同、荧光发射强度相当、在仪器上各荧光信号彼此能够分开的荧光探针标记样品。

当用激光共聚焦显微镜系统检测来自样品的光信号时，利用滤片、狭缝或光栅将不同的几种荧光物质发射波长分开到不同的通道中，到达各自的监测器，这些不同通道的荧光往往被设定为不同的伪颜色，在显示器上分别显示出相应颜色的共焦图像，以易于观察。

当几种荧光物质的荧光发射峰相距很远、彼此干扰很小时，可将不同的发射波长

分为不同的荧光通道检测，以测定各个组分的荧光强度。此时，这几种物质的激发波长可以相同，也可以不同，只要激光光源有相应的激发谱线即可。例如标记DNA的HO33258的蓝色荧光与标记蛋白质的Cy5的红色荧光，如果标记条件适宜，一般能够完全分开，因此可以同时检测。

通常避免或排除光谱交叉干扰的方法有以下几种：

（一）使用几种荧光探针时，尽量选择相互之间无光谱交叉的荧光探针

要根据仪器条件和荧光探针的特性，选择那些发射光谱没有交叉、荧光发射强度匹配的荧光探针标记样品。

（二）低标记荧光强度

样品的一种或几种荧光的强度太高，有时会导致光谱交叉的出现。采用降低标记物浓度、缩短标记时间、调整探针介质等方法可降低样品的荧光强度。

（三）采用顺序扫描方法克服光谱交叉

所谓顺序扫描主要是指用不同波长激光轮流照射样品，同时在相应的荧光检测通道轮流采集并显示每种荧光的共聚焦图像。其原理是，对于荧光物质，如果没有激发光就不会有荧光产生，因此虽然两种荧光探针同时存在，但是如果没有受到同时激发，则会减少光谱交叉现象的影响。据此，激光扫描共聚焦显微镜设计了顺序扫描方法，用不同波长的激光分别激发荧光样品，分别采集相应的共焦图像，同时分通道显示每种荧光的共焦图像。例如，对于双重荧光样品，其具体操作过程是：首先只用一种激光激发相应的第一种荧光物质，在第一通道显示其荧光图像，再用另一种激光激发另一种荧光物质，在第二通道显示其荧光图像，相应的顺序扫描软件能够将两通道的不同荧光图像同时分通道显示并叠加合成，展示出两荧光间空间定位关系。依次类推，用顺序扫描方法还可以采集三重或更多重荧光样品的图像。

目前很多型号的共聚焦显微镜系统具有顺序扫描功能。

对于用易淬灭探针标记的多荧光样品，要尽量使用低强度激光照射并缩短照射时间，在顺序扫描过程中，先采集易淬灭的荧光信号，可以减少光刺激作用。例如FITC与HO33258标记的样品，前者用488nm激光激发，后者用364nm紫外激光激发。FITC在紫外光的照射下容易淬灭，为此使用顺序扫描法取图时，要先采集FITC的荧光信号，后采集HO33258的信号。另外，光敏样品不宜进行长时间反复样品采集。

（四）修改检测仪器的检测条件

对于图像上出现比较弱的荧光交叉信号，有时能够通过改变仪器的检测条件来克服。常用的措施有：降低干扰荧光的激发光强度以降低其发射荧光强度，减小被干扰通道的检测灵敏度，改变激发波长和检测波长范围等。例如荧光通道2的图像上看到了来自通道1的较弱的荧光交叉信号，这时在保证采集到各通道清晰图像的情况下，降低通道1的激发强度，减小通道2的光电倍增管（photo multiplier tube,

PMT）以降低其采集的灵敏度，小范围内改变各通道的检测波长，有时可以消除来自通道 1 的荧光交叉信号。

（五）荧光光谱鉴别法

通常情况下，不同的荧光物质的荧光光谱不会完全重合，利用不同的荧光光谱之间的差异，可以将来自于两种荧光物质的荧光信号鉴别开来，得到各自的荧光图像。

第三章　荧光染料(色素)的早期应用和发展史

1838 年 Brewster 首先描述了荧光现象,1852 年 Stokes 发现有些物质在短波光的照射下,物质本身能放射出一种比激发光光波波长长的光波,他把这种光称为荧光,并提出“荧光”一词。这些能够产生荧光并能作为染料的化合物即为荧光色素,此后多种荧光物质被陆续发现。Wood 在 1903 年设计出了能吸收可见光并允许紫外光透过的滤片,在此基础上,Reicherl 于 1911 年发明了首台荧光显微镜。荧光显微镜制成后,由于人和动物组织的自发荧光很弱,当时荧光技术在生物学中的应用并不令人满意,直到 1930 年荧光物质才真正被用于固定细胞和组织的染色。Haitinger 于 1935 年发现用非常稀薄的有机色素溶液处理组织后,可使标本的荧光强度增强,从而可以观察组织的继发荧光。同普通染色剂相比,荧光染色的灵敏度要高出 100～1 000倍。以后,由于荧光染色方法和荧光观测装置的改进,特别是荧光抗体技术的建立及激发光源和滤片系统的发展,使荧光显微镜技术在细胞学、微生物学、免疫学等方面得到了广泛的应用。近年来,随着科学技术的飞速发展,各种先进的检测手段,如流式细胞仪、激光共聚焦显微镜等相继出现;同时,荧光染色技术不断改进,各种商品化的新型荧光探针也陆续推出,荧光染色早已超出了组织细胞的概念,被用于观察分子水平上的各种生命现象。目前,荧光技术广泛应用于生命科学研究的各个领域。

一、染料的早期应用和发展

染料最早是应用在丝、麻、棉等纺织品的印染上,我国周朝初期的印染工艺已相当发达,此时人类在染色剂和染色方面已经积累了一些知识。

在 1714 年,Leeuwehoek 首先应用天然染色剂研究肌肉组织,用番红花浸染切片,得到了较好的结果。当时人们使用的全是从动植物和矿物中提炼的天然染料,如靛青、朱砂、胭脂红等。

1856 年,William Perkin 偶然制得了第一个人工合成的煤焦油染料——苯胺紫(mauve,aniline purple),从此开始了人工合成染料的时代。此后,一些化学家采用 Perkin 的方法,以氟化苯胺作原料,相继合成了其他很多染料。为首的就是 1859 年合成的蔷薇苯胺(品红)(rosaniline),也称为复红(fuchsin)。后来又合成了副品红(Pararosaniline)、甲基紫(methylviolet)、龙胆紫(gentianviolet)、结晶紫(crystal vio-

let)、甲基绿(methyl green)、孔雀绿(malachite green)、亮绿(brilliant green)、藏红 O(safranine O)、亚甲基蓝(methylene blue)、碳花青(gallo cyanin)和各种偶氮染料(如碱性棕 bismarck brown)。随后,这些染料逐渐商品化并应用于组织标本、血液标本、细菌标本的染色,新的染色方法随之建立。

二、荧光染料(色素)的早期应用和发展

在人工合成染料的时期,也出现了具有荧光性的染料,其中氧杂蒽和吖啶(氧杂蒽的衍生物)、派若宁 Y(pyronin Y)、罗丹明 B(rhodamine B)、荧光黄(fluorescein)、曙红 Y(eosin Y)、赤藓红(erythrosin)等都是很有名的吖啶类染料。早期的吖啶类染料,主要有碱性染革黄棕(phosphine)、吖啶黄(acridine yellow)、吖啶橙(acridine orange)、吖啶黄素(acriflavine)等。有些染料,如金胺 O(auramine O)、亮磺黄素(brilliant sulphoflavine)、中性红(neutral red)、副品红(pararosaniline)等,来源于其他试剂。Kasten 描写了组织学和组织化学中常用的一些吖啶类染料。

尽管 20 世纪初就有很多荧光探针可供使用,但人们真正用过的却很少。组织学家、细胞学家和细菌学家喜欢染色能力很强的红色、蓝色和绿色染料,而这些染料在溶液中大多没有荧光或荧光很弱。只有派若宁 Y 和曙红 Y 等红色染料是例外。吖啶类染料通常把细胞染成黄色,因而不大常用。碱性品红(含有副品红和品红碱的混合物)在 1863 年被 Waldeyer 引进组织学研究以后,就成为一种重要的细胞核染料,它对于细菌学,特别是对于用以研究结核杆菌这类耐酸微生物体的 Ziehl-Neelsen 法的发展起过重要影响。龙胆紫是 Weigert 和 Ehrlich 分别在 1881 年和 1882 年引入微生物技术中的,它在 1884 年就成了 Gram 染色液的主要成分。1885 年,Ehrlich 用亚甲基蓝作为第一个重要的活体染料,并阐明了它对神经组织的亲和性。他还把许多其他染料引进该领域,比如他的著名的三酸混合物(甲基绿,酸性品红,橙 G)。

直到 20 世纪 30 年代初期,即在荧光显微镜研制成功 20 多年后,吖啶类和其他荧光染料才被用于固定细胞和组织的荧光显微术。Krause 的《显微技术大全》收录了很多染料,但对吖啶类染料却只字未提。在其他方面都很有参考价值的这部著作中,关于荧光显微镜的章节,也只提到了其在观测组织切片自身荧光中的应用。当时的显微镜学家还没有认识到这样一个事实:即用荧光显微镜观察时,荧光染料能提高染色组织的观察灵敏度和清晰度。人们错误地以为,由荧光染料诱导荧光的显微镜观察,会产生赝像而导致曲解。

虽然荧光染料很多年来未被用于固定组织、细胞的染色,但在其他方面却得到了应用。人们知道,在水溶液中,荧光素会产生很强的黄绿色荧光,即使用水稀释 1.6×10^7 倍,其钠盐仍可产生浅绿色的荧光。Ehrlich 用它来显示眼内液体的流动。1906 年,荧光素在美国成为第一个用于地下水示踪的荧光探针。随着一战中治疗伤员的需要,吖啶黄素被确认为有效的抗菌剂。这种染料被英国科学家称为“黄素”。

和吖啶黄素很接近的原黄素是另一种有用的抗菌剂。后来证明这两种染料都是有用的核酸荧光染料。

三、荧光染料(探针)在活细胞中的早期应用和发展

在19世纪末,药物学家和实验治疗学家就对荧光染料能导致微生物发光的性质表现出了浓厚的兴趣。人们认识到,这种增强的发光是光致发光。Tappeiner 和 Jodlbauer 的一部重要著作讲述了这方面的研究。吖啶染料是治疗锥虫的有效药物,Ehrlich 用吖啶黄素对付老鼠体内的这种原生动物,并取得了显著效果。这种染料因其能影响锥虫而被称为"锥黄素"。显微镜学家用明视野显微镜观察了这类染料和微生物体的结合。

原生动物学家 Provazek 显然是用荧光显微镜研究染料和活细胞结合的第一人。他把各种荧光探针和药物(如荧光素、曙红、中性红、奎宁等)加到纤毛豆形虫的培养液中,并用荧光显微镜观察了细胞的染色荧光。他掌握了这种实验方法的基本特点,其目的是:把各种类型的物质(不管是染料还是无色药物)引入细胞,假定它们服从一定的分布规律并在一定的条件下富集在细胞的特定成分中,那么它们在荧光显微镜的暗视野中就可以突出显示细胞的部分结构。

1914年,荧光染料(探针)被引入荧光显微术中,标志着实验细胞学向前迈了一大步。Provazek 的报告首次描述了活体荧光探针。以后,有人用活体染料(包括荧光探针)进行原生动物试验,但只限于用明视野显微镜观察。

1932年,匈牙利药物学家把几种不同的荧光探针注入预先感染了锥虫的啮齿动物体内,从而创立了活体荧光探针技术。荧光显微镜下的血涂片观察表明,荧光染料和核酸及带血锥虫的基本部分有特异结合。

20世纪30年代由于对化疗特别感兴趣,人们做了各种努力,试图确定染料在什么位置和动物及人体内的疟原虫结合。人们在荧光显微镜下发现,在所试验的各种荧光探针中,喹吖因(即阿的平)在注射后的10s内能被循环淋巴液选择吸收。

将吖啶黄素加到成纤维细胞培养液中,在显微镜下可看到,试验浓度下它能阻止细胞的分裂。用荧光吲哚碳花青染料标记脂蛋白,可在体外研究动脉粥样化形成过程中脂蛋白的代谢。

通过这些研究,人们明白对于某些氨基,吖啶能优先和细胞核成分结合。对这种结合机理的研究,弄清了染料对核酸的结合。这种强相互作用已被体外及低 pH 区固定细胞中的纯化核酸所阐明。

在 Ehrlich 阐明荧光素能示踪眼内液体的流动之后,Thief 将裂隙灯显微镜加以改进,试图观察眼内染料的荧光。但当时荧光显微镜用的光源是经聚光镜会聚的透射光,对大多数不透明的活器官标本无法观察。

1929年,海德堡(Heidelberg)大学的药物学家 Philipp Ellinger 和年轻的解剖学

家 August Hirt 合作，对荧光显微镜做了重大改进，在这种荧光显微镜中，光源的垂直入射光直接通过侧边的透光管经物镜会聚于样品上，发射的荧光沿透光管返回到观察者眼中。别的基本部件还有相应的滤光片和一个浸在水中的物镜。这台被称作"体内活体显微镜"的仪器，可以认为是第一台落射荧光显微镜。他们用这种显微镜观察了动物体内注入荧光探针后的肾脏的微循环。荧光素和吖啶黄素的稀释溶液被用于研究尿液形成的生理学。很多科学家对体内活体荧光显微镜产生了兴趣，并试验了各种荧光探针，如亮碱性染革黄棕 G(phosphine G)、吉耳曼宁 S(germanin S)、樱草灵黄(rimulin yellow)、rheonin A、噻唑黄(thiazole yellow)、硫磺素(thioflavine)等。

在 20 世纪 30 年代，人们用这种荧光新技术观察了活体皮肤、肝脏、肾脏、结膜和肾上腺。在第二次世界大战期间，August Hirt 竟然进行了非人道的活体试验，用体内活体荧光显微镜观察人体内的组织。

为满足生物学研究的需要，活体荧光探针必须在等渗、无毒和无猝灭剂的条件下使用，Elligner、Prince、Schwartz 和 Kasten 等人对这方面早期的研究做过综述。

近年来，由于现代落射荧光显微镜、显微荧光扫描仪、数码成像采集系统等先进设备和方法的应用，微循环的体内活体显微术又重新受到欢迎。Pascal Gervaz 等人将低密度脂蛋白进行酰化，然后与一种荧光探针(dioctadecyl-indocarbocyanine)结合，当肝窦内皮细胞摄取这种标记的低密度脂蛋白后，便可用荧光显微镜进行鉴定。研究人员将 100μL 荧光标记的低密度脂蛋白经门静脉注入 BD IX 大鼠体内，两天后再从门脉内注入 10^7 个 DHD K12 细胞，这是一种化学诱导生成的 BD IX 大鼠结肠癌细胞系。一周后处死大鼠，取出肝脏标本进行常规组织学检查，并用大鼠内皮细胞单克隆抗体进行免疫组织化学染色。结果发现：在正常肝实质组织中，肝窦内皮细胞出现荧光，而大血管内皮未出现荧光染色，说明仅肝窦内皮细胞能摄取乙酰化的低密度脂蛋白。在发生肿瘤转移的肝脏内出现荧光的空间梯度，标记的内皮细胞聚集在转移灶的周围。当转移灶超过 200μm 后，便出现新生血管的形成，同时荧光标记的细胞从周围侵入转移灶内，并在肿瘤体内排列成管状。还有人用该显微镜和吖啶橙对啮齿动物的肝脏微循环进行了定量研究。

四、荧光染料(探针)在植物研究中的早期应用和发展

当荧光探针用于植物标本时，会产生一些异常的颜色组合：自身荧光常和染色荧光共存。例如，用荧光显微镜观察萘红(magdala red)染色的树叶切片时，可看到红色的角质层，橘红色的初级韧皮部和次级韧皮部，蓝色的木栓形成层和亮红色的木质部。有些荧光色素，可在同一细胞中诱导产生两种颜色的荧光，如用 corip hosphine O 时，可看到橙色的细胞质和黄色的核酸。当用吖啶橙处理含有死细胞的混合液时，也可观察到这种多色荧光现象。比如，在 pH 为 5.7～8.0 时，植物表皮的活细胞发

绿光，而死细胞发红光。

Mundter 大学的植物细胞生理学家 Siegfried Strugger 发现吖啶橙(AO)有将活细胞和死细胞染成不同颜色的独特性能。他用明视野显微镜研究了其他很多染料对细胞的活体染色，并在 1931～1940 年间发表了一系列论文，为他的这一发现奠定了基础。在观察组织或细胞荧光时，大多数科学家都没有考虑到染色液 pH 值的影响，而只是简单地将染料配成稀溶液。但 Hercik 报道说，在 pH 为 1.5 时用荧光素对洋葱表皮细胞进行体内活体染色后，死细胞和活细胞会产生不同的荧光图像。作为一个细胞生理学家，他敏感地意识到了 pH 值对带电荷的荧光探针和胞内组分之间的结合的重要性。他还认识到染料浓度可能会影响其在溶液中的存在形态。他在战争年代完成并报道了这些研究成果。他用 AO 和其他几种荧光染料进行了荧光显微研究，并基于这些研究在 1940～1944 年发表了近 20 篇研究论文。第二次世界大战后不久，他着手总结战时德国在细胞生理学和植物细胞原生质方面的研究成果。回到德国后，他撰写了两部著作，其中的一部就是关于荧光显微镜的。Strugger 的富于创见的工作，直接导致了 AO 作为核酸荧光探针在荧光显微术、流式细胞术中的现代应用。

Strugger 在荧光显微术方面的工作是开创性的，具有重大意义。在这些工作中，他系统地研究了植物活细胞对 AO 的吸收和存储。他发现，细胞内的荧光颜色在一定程度上依赖于染料的浓度，这就是“浓度效应”，后人又称之为“Strugger 效应”。当 AO 浓度低((1∶5 000)～(1∶10 000))时，发绿光；浓度高(1∶100)时，发红光；中等浓度时，发黄光。Strugger 还指出，通过荧光显微术，AO 能辨认植物细胞是死的还是活的。因为 pH 为 5.7～8.0 时，活细胞显绿色，而死细胞显红色。在 pH 大于 4.7 时，AO 能使死细胞的细胞质显红色。在低 pH 时，细胞核显红色；当 pH 升到6.8时，开始变成黄绿色。后来有人证实，死细胞和活细胞确实可以产生不同颜色的荧光。Strugger 和他的同事们又对酵母菌、霉菌、细菌和精子进行了活体实验。AO 染色产生的双色荧光引起了人们对这种荧光异色现象的注意。在荧光 pH 指示剂的细胞生理学应用方面，Strugger 遥遥领先。

Strugger 认为，活体染色后之所以会产生不同颜色的荧光是由于细胞蛋白和 AO 阳离子的结合程度不同。在活细胞中，蛋白上大概不存在负电荷，对 AO 阳离子的吸附很弱，结合态染料的浓度很低，产生绿色荧光；而在受损细胞和死细胞中，由于静电作用，蛋白对 AO 的吸附逐渐增强，因而分别产生黄色和红色的荧光。Strugger 假定，随着细胞的损伤和死亡，蛋白的亚显微结构受到破坏，带上更多的负电荷，对 AO 的吸附也相应增强。死细胞质中铜红色荧光的出现，为研究精细结构的变化提供了看得见的证据。

Strugger 还发现，AO 可用于测定细胞蛋白质的等电点。在乙醇固定的标本中，含蛋白的组织在等电点以下发绿光，在等电点以上发铜红色荧光。

后来又有很多科学家对 AO 和活细胞的相互作用进行了深入研究，并对 Strug-

gér 的解释提出了质疑。他们认为双色荧光与细胞的代谢活性以及染料和 DNA、单核苷酸、多糖、溶酶体及核蛋白复合物等的结合有关。AO 的荧光异色现象主要是由于染料单体、二聚体和多聚体等的形成而导致的，AO 和核酸可以形成各种复合物，包括染料分子插入 DNA 碱基之间(发绿光)以及染料和核酸表面的磷酸根作用(称为堆集)。

Schummelfeder 详细研究了 AO 和固定细胞的结合，他强调 pH 值对于 AO 和细胞内组分结合之动力学的重要性。用 pH 法测量组织蛋白等电点的方法也得以证实。很多研究者提出，在酸性染色条件下，AO 阳离子易于和酸性组分结合，如软骨和柱细胞颗粒中的酸性粘多糖和核酸。有 3 个研究小组各自独立地发现，在完全相同的条件下，用 AO 染色，固定中间相的核酸和染色体 DNA 发黄绿色到绿色荧光，而富含 RNA 的区域发橙色到红色荧光。有人指出，引起颜色差异的是 DNA 和 RNA 分子大小和构型的不同，而不是 DNA 和 RNA 之间的固有的化学差异。Rigler 用显微荧光分光光度法研究了 AO 与纯化核及胞内核酸的结合机理。他证实，DNA 二级结构的有序程度对 AO 的结合有重要影响。由于癌细胞中核染色质及 RNA 的含量增多，用 AO 染色法可以很明显地看到癌细胞和正常细胞的颜色差异。在检测和鉴定纯化的或病毒感染细胞核酸时，AO 被证明是一种灵敏的细胞化学荧光探针。有人用极化荧光显微术研究了染色体中 DNA 的构造。作为检测染色体中 DNA 的荧光探针，AO 可在染色臂上产生均一的荧光。为得到单细胞中 RNA 和 DNA 含量以及 DNA 分子变异的定量信息，也有人采用微荧光术。

第四章　常用的荧光染料(探针)

第一节　细胞器荧光探针

细胞器的荧光探针是一类能渗透到细胞内,并能选择性地与细胞中的细胞器结合的荧光物质,其实质是荧光染料。细胞器的荧光探针不但可用于固定细胞中的细胞器染色,而且还可以用于活细胞中的细胞器染色。荧光染料选择性地与线粒体、溶酶体、内质网和高尔基体结合,再利用荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜观察,可得到这些细胞器的高分辨率的清晰图像;并且还可以动态观察活细胞的形态学变化。这些探针为研究细胞内的氧化作用、有丝分裂、酶降解作用、解毒作用等提供了有效手段。结合免疫组化、原位杂交技术和体视学分析等新技术新方法,可以从分子生物学水平定量研究细胞的病理和生理变化,还可以用来分析细胞的能量代谢,物质合成和转运,膜电位的变化以及鉴别细胞类型。不同的细胞器因其形态结构及功能不同,所要求的探针也不尽相同,而同一种细胞器又常可标记几种探针,并各具特点。

一、线粒体荧光探针

线粒体存在于各种真核细胞内,是负责有氧代谢的细胞器,其基本形态呈长杆状、线状、卵圆形或圆形小体。基本结构由平滑的外膜和向内突起形成皱折的内膜组成。线粒体的形态和数量随细胞的类型、细胞代谢水平和细胞所处的细胞周期及增殖状态的不同有所差异。如:心肌细胞的线粒体嵴排列很不规则;肾上腺皮质细胞的线粒体嵴呈小管状或泡状。在动物褐脂细胞、肝细胞和肾小管上皮细胞线粒体丰富;而在静止的免疫系统原始细胞内线粒体很少。

线粒体是细胞的供能站,含有丰富的酶系统,包括磷酸化酶、细胞色素酶、琥珀酸脱氢酶和 ATP 酶等。ADP 在磷酸化酶的作用下与焦磷酸结合生成 ATP,ATP 在水解酶的作用下释放出能量,供细胞利用,以完成蛋白质和核酸合成,物质转运和细胞分泌及分裂等功能。

线粒体的荧光探针主要有:JC-1,Rhodamine 123,Rhodamine 6G,DiOC7(3),Acridine orange-10nonyl bromide,DASPMI 和 DASPEI。

(一) JC-1

JC-1(英文化学名为:5,5′,6,6′-tetrachloro-1,1′,3,3′-tetrathy benzimidaly carbocyanine iodide)。JC-1 在浓度或线粒体膜电位低时,以单体存在,激发波长为 490nm,发射波长为 527nm,呈绿色荧光。当浓度升高或线粒体膜电位升高时,JC-1 形成 J-聚体,呈橙色荧光,此时激发波长为 490nm,发射波长为 590nm。

JC-1 的用途主要有以下几方面:

(1) 通过定量分析技术检测活细胞内线粒体膜电位的变化;

(2) 通过流式细胞技术分析药物效果;

(3) 用于人类脑脊炎的检查;

(4) 追踪凋亡细胞中线粒体变化;

(5) 监测线粒体中毒,缺氧情况;

(6) 检测 ellipticine 对线粒体膜电位的作用效果。

尤其重要的是 JC-1 在检测活细胞内线粒体膜电位的应用。在各种 J-聚体形成型探针中,JC-1 是检测活细胞线粒体膜电位最合适的探针。

(二) Rhodamine 123

Rhodamine 123 是一种能渗透入细胞,带阳离子的荧光探针。激发波长为 505nm,发射波长为 534nm。活细胞摄取 Rhodamine 123 达到平衡的速度较快,只需 5min,通过激光扫描共聚焦显微镜观察,可见到线粒体被 Rhodamine 123 染成绿色。与亲脂性 Rhodamine 及碳酸花氰苷染料不同,Rhodamine 123 不能染色内质网。当细胞被反复冲洗时,Rhodamine 123 通常不被细胞保留,但许多癌细胞(不包括肉瘤或白血病细胞)可较长时间保留这种染料(>24h)。因此,它有助于某些癌症的诊断。

Rhodamine 123 的用途主要有以下几个方面:

(1) 通过流式细胞仪技术挑选代谢障碍的酵母菌;

(2) 分离对有丝分裂原刺激敏感的淋巴细胞;

(3) 细胞凋亡的观察;

(4) 线粒体的轴浆转运观测;

(5) 细菌的生存力及活力检测;

(6) 线粒体酶活性的检测;

(7) 线粒体的跨膜电位及膜的其他功能活动的观测;

(8) 多种药物的相互拮抗研究;

(9) 分枝杆菌的药物敏感性研究;

(10) 卵母细胞的突变检测。

二、溶酶体荧光探针

溶酶体为单层脂蛋白膜包绕的内含一系列酸性水解酶的小体，形态学上只有联合运用电镜和细胞化学方法才能肯定地加以确认。根据溶酶体是否含有作用底物，可将其分为初级溶酶体和次级溶酶体两类。初级溶酶体仅含水解酶，但无作用底物，细胞中均可见到，如有粒白细胞中的特殊颗粒；次级溶酶体含水解酶和相应的底物，以及形成的消化产物，根据底物的来源不同分为自生性、异生性和混合性三种。

溶酶体中含有多种酶，是物质代谢的场所。主要功能是消化分解细胞内高分子物质。如使蛋白质分解为二肽或游离氨基酸，使碳水化合物分解为单糖，使核苷酸分解为核苷和磷酸，使中性脂肪或磷脂分解为游离脂肪酸、甘油或甘油酸二脂等。溶酶体膜对细胞具有保护作用，使溶酶体内消化酶与周围细胞质隔离，阻止酶进入胞质中，避免细胞自身消化。

溶酶体的荧光探针主要有 DAMP 和中性红(Neutral Red)两种。

(一) DAMP

DAMP(英文化学名为：N-(3-((2，4-dinitrophenyl) amino) propyl)-N-(3-aminopropyl) methylamine)，它是一种弱碱性胺。DAMP 可被酸性细胞器摄取并聚集，通过激光扫描共聚焦显微镜可获得溶酶体图像，呈蓝色荧光，激发波长是 346nm。

DAMP 的应用主要有以下几个方面：

(1) 海胆胚卵黄小片的酸化；

(2) 检测囊样纤维变性患者的细胞器的酸化；

(3) 胰岛素原在 β 细胞内转换对 pH 值的依赖性；

(4) 自嗜性空泡的变化。

(二) 中性红(Neutral Red)

中性红也是一种用于检测溶酶体的探针，呈红色荧光，激发波长为 541nm，发射波长为 640nm。

三、内质网荧光探针

内质网可分为粗面内质网和滑面内质网两种。粗面内质网主要由扁平的并常呈平等排列的互通式的池构成，其膜表面附着有直径为 15nm 大小的电子致密颗粒(即核糖体)，大多数池为扁平状，切面呈管状或泡状。滑面内质网表面平滑，无核糖体附着，通常分为分支、小管或小泡的网状结构，有时可以看到两型内质网相互连接。

粗面内质网的功能主要是合成蛋白质，包括肽类激素、酶素、抗体和结构蛋白。不同组织细胞中滑面内质网的功能不同，如在肝细胞中与解毒和糖代谢有关；在肾上腺皮质细胞中与甾体类激素合成有关；在骨骼肌细胞中与肌纤维收缩有关。总之，滑

面内质网的功能是多方面的。

内质网的荧光探针主要有：$DiOC_6(3)$，$DiOC_5(3)$，$DiIC_{16}(3)$ 和 $DiIC_{18}(3)$。

(一) $DiOC_6(3)$

$DiOC_6(3)$(英文化学名为：3,3′细胞用-dihexyloxacarbocyanine iodide)，属于短链碳酸花氰苷染料，激发波长为459nm，发射波长为584nm。$DiOC_6(3)$不仅可用于标记活细胞中的内质网，而且可用于甲醛固定的细胞中的内质网。$DiOC_6(3)$进入细胞内与内质网结合，在激光激发下发出绿色荧光，根据内质网的形态学特征很容易识别。

在相对低浓度时，$DiOC_6(3)$聚集在线粒体中，而在高浓度时，则可聚集于其他膜性细胞器，包括内质膜。$DiOC_6(3)$是几种有相似染色性质的染料中最明亮，最宜于摄影成像的一种。这些染料包括 $DiOC_2(3)$，$DiOC_3(3)$，$DiOC_4(3)$，$DiOC_4(5)$，$DiOC_6(5)$，$DiIC_1(3)$，$DiIC_3(3)$，$DiIC_4(3)$，$DiIC_6(3)$，$DiIS_3(3)$，Rhodamine 6G 和 Rhodamine 3B。这些染料能使细胞器染色，它们由多环的荧光部分附加烃基(即—CH2或—CH3)相联。烃基似乎能增加染料对膜的亲和性。对 $DiOC_6(3)$和相关染料与细胞的相互作用最直接的解释是，染料通过细胞膜，分隔所有细胞内膜的脂质层。

培养细胞染色时，将适量 $DiOC_6(3)$加到培养基中染色。在实际工作中，应根据标本的不同，找出最佳的实验条件。如 Lee 等将 CV-1 细胞(一种非洲猴的肾细胞)在培养基中加 2.5μmol/L $DiOC_6(3)$染色 5min；Dailey 等将大鼠神经节细胞用含0.3μmol/L $DiOC_6(3)$的培养基染色 10min；Sanger 等将 Ptk-2 细胞(一种袋鼠的上皮细胞)用 0.5μmol/L $DiOC_6(3)$的培养基染 5min 后观察细胞。一般来说，游离细胞标本比活细胞更易染色。

戊二醛固定的细胞用 $DiOC_6(3)$染色效果很好。用 2.5μmol/L $DiOC_6(3)$染色10min，这种染色与活细胞染色相比更稳定，并且不存在低浓度时仅能使线粒体染色的情况。实验证明，活细胞如果用 $DiOC_6(3)$染色后摄像，或用戊二醛固定后再染色、摄像，结果内质网模式完全相同，说明戊二醛固定能很好地保留内质网的分布状态。但在戊二醛固定的细胞中胞浆膜上随时产生气泡，戊二醛固定的细胞在染色的最初10～20min 之内最有效。甲醛固定会使内质网产生较多气泡，而甲醇固定会使内质网膜破坏，所以不能用这两种固定液固定细胞。

(二) $DiOC_5(3)$

$DiOC_5(3)$(英文化学名为：3,3-dipentyloxacarbocyanine iodide)，激发波长为484nm，发射波长为 509nm。它和 $DiOC_6(3)$一样，也属于短链碳酸花氰苷染料。其染料特点及用途与 DiOC(3)相似。

(三) $DiIC_{16}(3)$ 和 $DiIC_{18}(3)$

$DiIC_{16}(3)$(英文化学名为：1,1-dihexadecyl-3,3,3′,3′-tetramethyl indocarbo cyanine perchlorate)，激发波长为 550nm，发射波长为 564nm；$DiIC_{18}(3)$(英文化学名

为:1,1-dioctadecyl-3,3,3′,3′-t tetramethyl indocarbocyanine perchlorate)激发波长为 550nm,发射波长为 565nm,均呈黄色荧光。

$DiIC_{16}$(3)和 $DiIC_{18}$(3)分子结构与 $DiOC_6$(3)大致相同。$DiOC_6$(3)有两个更长的碳链,使 DiI 不能透过膜。一旦 DiI 结合到膜内,它就保留膜中。它在膜的两层内自由扩散。这样就传播到整个与它结合的那个连续的膜内。DiI 已经用来标记神经元细胞和肌细胞的内质网。有人用共聚焦显微镜在未受精的卵中观察内质网,而且能在受精卵中可观察到组织再生。

四、高尔基复合体荧光探针

高尔基复合体包括扁平囊泡、小泡和大泡三种基本成分。在一定类型细胞中,高尔基复合体的形态和位置较恒定,如在神经元中,高尔基复合体位于核周围;在肝细胞中位于细胞核与毛细胆管的区域内。凡具有分泌功能的细胞,高尔基体均发达。如胰腺细胞、唾液细胞和小肠上皮细胞。

高尔基复合体的功能主要是将由粗面内质网运来的蛋白类物质进行加工、浓缩、储存和运送,最后形成分泌泡排除。

高尔基复合体的荧光探针主要有 NBD Ceramide 和 BODIPY Ceramide 两种。

(一) NBD Ceramide

NBD Ceramide(英文化学名为:6-((N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl) amino)crproyl) sphingosine),呈绿色荧光,激发波长为 464nm,发射波长为 532nm。NBD Ceramide 是目前应用较广泛的选择性染色高尔基复合体的探针。它适用于活细胞和固定细胞的染色。

NBD Ceramide 目前已被应用于以下方面的研究:

(1) 检测药物对高尔基复合体和内质网之间的蛋白转运的作用效果;

(2) Farber. 3 病(一种遗传性脂代谢异常的疾病)的研究;

(3) 细胞内凝血酶受体的转运和标记;

(4) 通过荧光素化细胞分类法研究孤立的分泌突变体的分泌活性。

(二) BODIPY Ceramide

BODIPY Ceramide(英文化学名为:N-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-bora-3a,4a-diaze-s-indacene-3-pentanoyl) sphngosine),呈红色荧光,激发波长为 505nm,发射波长为 511nm。用这种探针标记的高尔基复合体既可用荧光显微镜观察,也可用电子显微镜观察。

根据荧光探针的性质及应用范围列出的其他常用细胞器探针,如表 4-1 所示。

表 4-1　其他常用细胞器荧光探针

探针名称	激发波长(nm)	发射波长(nm)	生物学应用
Pyronin Y	545	580	线粒体,把细胞阻断在 G_1 期
Acridine orange-10-dodecylbromide	493	520	线粒体
Rhodamine B hexyl ester,chloride	555	579	内质网
Rhodamine-dextran	570	595	植物线粒体
Rhodamine 6G	530	590	线粒体
Texas Red-ovalbumin	596	620	活细胞中的线粒体
Acridine orange-10-noyol bromide		Y	网织红细胞(血液学和流式细胞术)
Thioflavin T	370	418	神经细胞质的反标记

注:表中发射波长栏中,Y 代表黄色光。

第二节　细胞骨架荧光探针

细胞骨架是一类新发现的非膜性细胞器,因其具有高度活性和广泛的功能而日益受到重视。这些骨架能影响细胞的大小、形状、移动性、分裂和包括吸收及分泌的运送过程。应用荧光探针研究细胞骨架具有广阔的前景。

细胞骨架主要包括微管、微丝和中间微丝,而微丝主要由细丝(肌动蛋白为主)和粗丝(肌球蛋白为主)组成,以下着重介绍肌动蛋白及微管蛋白的荧光探针。

一、F-肌动蛋白荧光探针

目前发现,包括鬼笔环肽及其衍生物鬼笔毒素的荧光标记物是理想的 F-肌动蛋白探针。这种荧光探针的特点有:

(1) 与 F-肌动蛋白特异性结合,即使在纳摩尔浓度下也可标染肌动蛋白,一个鬼笔毒素可结合一个肌动蛋白亚基,鬼笔毒素不与 G-肌动蛋白单体结合;

(2) 使 F-肌动蛋白更为稳定:鬼笔毒素可抑制细胞松弛素、碘化钾或高温下对 F-肌动蛋白的解聚作用;

(3) 不影响肌动蛋白与其他蛋白质的结合:因鬼笔毒素分子量小(<1 200D),所以它与肌动蛋白结合后所占空间少;

(4) 不影响肌动蛋白的功能:当探针与肌动蛋白结合后,肌纤维仍可收缩,肌动蛋白丝仍可在固相肌浆球蛋白基质上移动;

(5) 可溶于水,易被可见光激发;

（6）对粗丝和细丝中的F-肌动蛋白无选择性。

这类探针种类繁多，最早使用的是NBD鬼笔环肽。后来出现了荧光素、罗丹明、BONIPY标记的鬼笔毒素。目前常用的BONIPY标记的鬼笔毒素系列有BONIPY FL、BONIPY 558/568及BONIPY 581/591。它们的激发波长及发射波长分别与荧光素、罗丹明及Taxas Red相似，但是它们的光稳定性好，且发射光谱区带窄。因而被广泛用于多重标记。其中BONIPY FL对pH值不敏感，且荧光团褪色慢。已成功用于F-肌动蛋白定量和分布测定。罗丹明标记的鬼笔环肽光稳定性也较好，且可竞争性地与肌动蛋白相结合，结合后荧光强度增高9倍，适用于F-肌动蛋白的快速定量。

根据荧光探针的性质及应用范围列出的其他常用F-肌动蛋白荧光探针，如表4-2所示。

表4-2 其他常用F-肌动蛋白荧光探针

探针名称	激发波长(nm)	发射波长(nm)	生物学应用
Alexa Fluor 350 phalloidin	346	446	
Coumarin phallacidin	355	443	
NBD phallacidin	465	536	
Alexa Fluor 488 phalloidin	495	517	
Fluorescein phalloidin	496	516	
Oregon Green 488 phalloidin	496	520	
BODIPY FL phallacidin	505	512	
Oregon Green 514 phalloidin	511	528	
Eosin phalloidin	524	544	
Alexa Fluor 532 phalloidin	528	555	
Rhodamine phalloidin	554	573	检测F-肌动蛋白
Alexa Fluor 546 phalloidin	554	570	
BODIPY 558/568 phalloidin	558	569	
Alexa Fluor 568 phalloidin	578	600	
BODIPY TR-X phallacidin	589	617	
Alexa Fluor 594 phalloidin	593	617	
Phallacidin-Bodipy	505	512	
Phallacidin-NBD	468	520	
Phalloidin-fluorescein	490	520	
Phalloidin-rhodamine	540	580	
Phallotoxin-phenylcoumarin	387	465	

二、G-肌动蛋白荧光探针

脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)能与 G-肌动蛋白特异结合。当 DNase I 标记上荧光素、四甲基罗丹明或 Texas 红等荧光基团即成为荧光探针,用于 G-肌动蛋白的检测。荧光素 DNase I 与 BONIPY 鬼笔环肽结合应用,可同时观察 F-肌动蛋白和G-肌动蛋白,研究活的非肌肉细胞中微丝结构的分裂情况。荧光标记的 DNase I 探针还可用于研究核苷酸,阳离子和细胞松弛素 D 与 G-肌动蛋白单体间的相互作用。

根据荧光探针的性质及应用范围列出的常用 G-肌动蛋白荧光探针,如表 4-3 所示。

表 4-3　常用 G-肌动蛋白荧光探针

探针名称	激发波长(nm)	发射波长(nm)	生物学应用
DNase I, fluorescein conjugate	494	517	
DNase I, Alexa Fluor 488 conjugate	495	519	
DNase I, Oregon Green 488 conjugate	496	516	检测 G-肌动蛋白
DNase I, Alexa Fluor 594 conjugate	590	617	
DNase I, Texas Red conjugate	597	618	

三、微管蛋白荧光探针

(一) 荧光素秋水仙碱探针

秋水仙碱可特异性地与微管蛋白结合,抑制微管蛋白装配。标记上荧光素后制成的荧光探针可用于微管蛋白的研究。此外,单纯的去乙酰基秋水仙碱可用于亲和层析,分离出微管蛋白。

(二) DAPI 探针

DAPI 属于核酸染料,但在体外可与纯化的微管蛋白结合,而不影响微管蛋白的装配或 GTP 的水解。DAPI 探针与微管蛋白结合后,可出现吸收光谱的偏移及荧光增强现象,此外由于它与多聚微管蛋白结合的亲和力比双聚微管蛋白高 7 倍。因此,这种探针可用于微管蛋白装配动力学研究。

(三) DCVJ 探针

DCVJ 探针成分为 9-(dicyanovinyl) julolidine,与微管二聚体的特异位点结合,是追踪活细胞内微管蛋白聚合的有效探针。DCVJ 在活细胞内的染色可被细胞松弛素 D 所阻断。可用于活细胞内微管蛋白的多聚化研究。另外,它也与牛脑钙调素相

结合发出强烈荧光，用于钙调素的研究。

（四）Bis-ANS 探针

Bis-ANS 是微管蛋白的抑制剂，它与微管蛋白的疏水区结合力强。结合位点在对微管装配有重要作用的接合区附近，远离抑制有丝分裂药物的结合位点。结合后有荧光增强现象。用于研究时间和温度依赖型的微管蛋白单体和二聚体的定位和结构变化。

四、微管选择性的紫杉醇探针

紫杉醇可用作研究微管的分子探针，其纯度经 HPLC 后需高于 98%。有些文献也称紫杉醇为紫杉酚，是一种二萜类化合物，为抗肿瘤剂。最初是从西方紫杉属树木的树皮中分离出来的，它的抗有丝分裂和细胞毒素的活性与它能促进微管蛋白装配成微管聚合体相关，这种聚合体不能通过降低微管蛋白的浓度、钙、低温或是其他破坏微管结构的药物而解聚。紫杉醇还降低了微管蛋白装配所需的临界浓度。培养细胞用紫杉醇处理后，会停滞在细胞周期的 G_2 和 M 期。

三种紫杉醇荧光衍生物：Oregon Green 488 paclitaxel(Flutax-2)，BODIPY FL paclitaxel 和 BODIPY 564/570 paclitaxel。这些衍生物是研究微管形成和运动性成像的有效工具。

Oregon Green 488 paclitaxel 是标记活细胞微管丝的一个重要探针。荧光标记物结合在紫杉醇的 7β-羟基位，可以选择性地和微管结合，在 37℃具有高亲和性。与 Oregon Green 488 paclitaxel 不同，BODIPY FL 和 BODIPY 564/570 paclitaxel 在大多情况下不适合标记细胞间的微管蛋白。

Tubulin Tracker Green reagent 可将活细胞中聚合型微管蛋白带上绿色荧光，是 Oregon Green 488 紫杉醇的二乙酰化体，也被称为 Flutax-2。它是一种不带电荷，非荧光的化合物，能够轻易地通过活细胞的质膜。一旦进入细胞内，亲脂性的阻断基被非特异性酯酶所降解，生成能产生绿色荧光和带电荷的紫杉醇。非乙酰化的 Oregon Green 488 紫杉醇以前被用于活细胞标记，然而 Tubulin Tracker Green reagent更容易通过细胞，标记更均匀，选择性也更好。

Tubulin Tracker Green reagent 有两种组分：低压冻干的 Tubulin Tracker Green reagent 和含有 20%Pluronic F-127 溶液的 DMSO。因为紫杉醇结合聚合型的微管蛋白，Tubulin Tracker Green reagent 会抑制细胞分裂和一些涉及到聚合型微管蛋白的功能。

根据荧光探针的性质及应用范围列出的其他常用细胞骨架探针，如表 4-4 所示。

表 4-4 其他常用细胞骨架探针

探针名称	激发波长(nm)	发射波长(nm)	生物学应用
AMA(3-amino-6-methocyacridine)	UV	Y,G	溶酶体,核酸
Bisbenzimide	360	530	神经核酸的反标记
Caacade Blue hydrazide	376,389	423	显微注射细胞的共价标记
Colcemid-NBD	468	520	微管蛋白多聚化检测
DASPEI(2-(4-dimethyl amino-styryl)-N-ethyl-pyrinium iodide)	429	557	线粒体(黄色),膜(绿色),核(橙红)
DASPMI	429	557	网状细胞
5,7-DHT(5,7-dihydroxytrptamine)	UV-B	G	细胞体外长期示踪

注:表中激发波长和发射波长栏中:B代表蓝色光,G代表绿色光,UV代表紫外光,Y代表黄色光

第三节 研究钙调节及活性的荧光探针

钙离子具有第二信使活性,它通过多种途径参与信号传递。它与钙离子受体相结合,进而激活蛋白激酶C,从而引起一系列生理作用,所以钙在细胞内信号传递过程中发挥了重要作用。

第二信号系统是当前研究的焦点,有以下几种荧光探针可供这方面的研究。

一、钙调蛋白荧光探针

钙的类似物如三氯化铽或其他三价镧系化合物可被激发荧光,可用于制备探针。它们能强烈地与钙调蛋白Ⅰ和Ⅱ位点相结合,用于钙调蛋白的研究。此外,加入Nd^{3+}可使这类探针的荧光淬灭。故可用来估计钙调蛋白Ⅲ和Ⅳ位点间的距离。另外,研究钙调蛋白时,可配合应用钙调蛋白拮抗剂如W-5,W-7等。

二、蛋白激酶C的荧光探针

蛋白激酶C(PKC)是激素信号转导过程中发挥关键作用的钙敏感性和磷脂敏感性酶,研究PKC具有重要意义。主要的荧光探针如下:

（一）佛波乙酸酯荧光探针

佛波乙酸酯是一种促癌剂。它能与蛋白激酶 C 特异性结合而发挥作用。用 BODIPY，Dansyl 和 NBD 标记的佛波乙酸酯（佛波十四酰乙酸酯的拟似物）即为荧光探针。它们各有特点，其中 Dansyl 佛波酯的荧光随它与 PKC 的结合而增强；BODIPY 佛波酯的荧光不易受环境影响。它们主要用于研究肿瘤细胞的信号传导，如 NBD 佛波乙酸酯已用于监测 Burkitt 淋巴瘤细胞中的 PKC 移位。

（二）乙酰辅酶 A 荧光探针

由于乙酰辅酶 A 能调节 PKC 的二酰基甘油活性，所以标记上荧光后也可间接监测蛋白激酶 C 的活性。研究 PKC 活性时，还可配合应用 PKC 抑制剂，如氮卓类 ML-9。

三、钙离子的荧光探针

钙荧光探针均以钙螯合剂 EGTA 为基础而合成的，它们与钙相结合的部位均位于羧基，结合后即有荧光变化。至目前已有三代钙荧光探针，第一代探针是 20 世纪 80 年代初合成的 quin-2，后又合成了能用于双波长比例测量的第二代探针，即 Indo-1 和 Fura-2，这两代钙的探针均需要紫外线激发。目前又合成了由可见光激发的第三代探针：Fura-3。Fura-3 的酯化形式即乙酰羟甲基酯（AM），不发荧光，但能透过细胞膜，在胞内的非特异酯酶作用下水解 AM，与游离钙相结合，荧光迅速增强50～100倍。目前这些钙荧光探针广泛应用于细胞内游离钙的测定。研究钙时可配合应用钙的指示剂如 TMB-8，它可阻断 Ca^{2+} 在平滑肌和骨骼肌细胞的肌浆网中的释放。

根据荧光探针的性质及应用范围列出的其他常用研究钙调节及活性的荧光探针，如表 4-5 所示。

表 4-5　其他常用研究钙调节及活性的荧光探针

探针名称	激发波长（nm）	发射波长（nm）	生物学应用
1. 膜和受体探针			
AO	490	530，640	多层脂质体
8-anilino-1-naphthalene sulphonic acid	385	485	确定亲水和疏水膜区的界面位置
Anthroyl ouabain	362，381	485	心糖苷受体
Dansyl lysine	340	515	低胆固醇膜
Dsansyl phorbol acetate	341	496	和受体结合的肿瘤促进剂模拟物

续表

探针名称	激发波长(nm)	发射波长(nm)	生物学应用
Dexamethasone rhodamine	549	568	糖皮质激素受体
1-Pyrene butyryl choline bromide	342	378～420	突触定位
Rhodamine B octadecyl este	560	590	疏水探针,膜熔化分析
2. 细胞膜电位和细胞内 pH 探针			
ADB-1, 4-diacetoxy-2, 3-dicyano-benzene	351	450～476	细胞内 pH(碱性条件下发射峰漂移)
BCECF-AM	500	530,620	胞内 pH
Bis-oxonol(DiSBa-C2(3))	540	580	膜电位
Carboxy SNAFL-2-(seminaphtho-fluorescein)	485,514 547	546(酸) 630(碱)	单激发-双发射 pH 指示剂
Carboxy SNAFL-1-(seminaphtho-rhodoflur)	518,548 574	587(酸) 630(碱)	单激发-双发射 pH 指示剂
1,4-Diacetoxyphthalonitrile	350	420～440	胞内 pH
4, 4′-diisothiocyano-2, 2′-stilbene-disulphonic acid	340	430	阴离子运输抑制剂
$DiOC_7(3)$	482	511	膜电位
$DiOC_2(3)$	482	500	膜电位
$DiOC_2(5)$	579	603	膜电位
9-(N-Didecyl)aminnoacridine	430	475	跨膜 pH 梯度
Merocyanine 540	500	572	膜电位,癌研究中区分
Oxonol V	609	645	膜电位
Rhodamine 123	510	534	线粒体和质膜电位
Vita blue dibutyrate-14(VBDB-14)	524	570(酸)	胞内 pH(双色荧光)
	609	645(碱)	
WW 781	603	635～645	膜电位
3. 离子探针(活体)			
Aequorin	–	469	钙离子存在下发光的荧光蛋白质
9-anthronyl choline iodide	320	420	钙离子接的钙调蛋白
Calcein	305,490	520	钙离子和镁离子
7-chlorotetracycline, aureomycin	345	430	膜附近自由钙离子
Fluo-3	506	526	钙离子
Fluo-2	335,362	505	钙离子(游离时最大激发波长在 362nm,与钙离子结合后在 335nm)

第四节　核酸荧光探针

目前核酸荧光探针在分子生物学领域中应用最广，主要应用于 DNA、RNA 的定量和定性分析。它们能以非共价键的方式与 DNA/RNA 相结合。根据它们能否穿膜透入活细胞内，可分为两大类：胞膜透过性和非透过性核酸探针。

一、透性核酸荧光探针

（一）SYTO 核酸染料

SYTO 是活体核酸透性染料。这种染料对核酸的亲和力较低，可通过被动运输扩散透过大多数细胞的细胞膜。对活细胞和死细胞的 RNA 和 DNA 都可以进行染色。同时，也可用于革兰氏阳性和阴性细菌的染色。染料通过紫外光（UV）或可见光的激发发出荧光。现在的染料可以发出蓝色、绿色、橙色和红色等几种颜色。这种染料有如下特点：

（1）可透过所有细胞的细胞膜；

（2）高吸光度，最大吸光系数大于 50 000M^{-1} cm^{-1}；

（3）自身荧光较低，当不与核酸结合时量子产率低于 0.01；

（4）当与核酸结合后量子产率高于 0.4。

各种 SYTO 染料间的特性都不相同，包括：细胞通透性，与核酸结合后荧光的增强度，激发和发射光谱，对 DNA/RNA 的不同亲和力等。SYTO 染色可以通过激光或者其他传统的宽谱带的激发光谱进行激发显色。

与专门对 DNA 染色的 DAPI 和 Hoechst 33258 不同，SYTO 还可以对 RNA 进行染色，因而，经过 SYTO 染色的细胞在细胞核和细胞质中都可以观察到染色。

由于有些 SYTO 染料在中性 pH 条件下带正电荷，因此也可以对线粒体染色。另外，SYTO 可以分别对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌染色。死亡的酵母细胞经过染色后出现明亮的荧光，活的酵母细胞在线粒体和细胞核都可以观察到荧光。一些 SYTO 的染色还可以用于观察细胞凋亡，还有一些与 SYTO 结构相似的染料用来研究细胞的多重耐药性。红色的 SYTO 染料可以被用来作为绿色荧光蛋白、凝集素或者细胞不透性的绿色 SYTOX 染料的复染剂。一些绿色的 SYTO 染料是良好的细胞核的复染剂。

SYTO 绿色染料是一种细胞透性的对 RNA 进行专一性染色的染料。在与 RNA 连接之后，此染料会发出较强的绿色荧光，但是当此染料与 DNA 连接时，发出的荧光十分微弱。用于对 FITC 染色的细胞进行检测的滤色片就可以用于观察 RNA 专一性的 SYTO 绿色染料的染色结果，如图 4-1 所示。

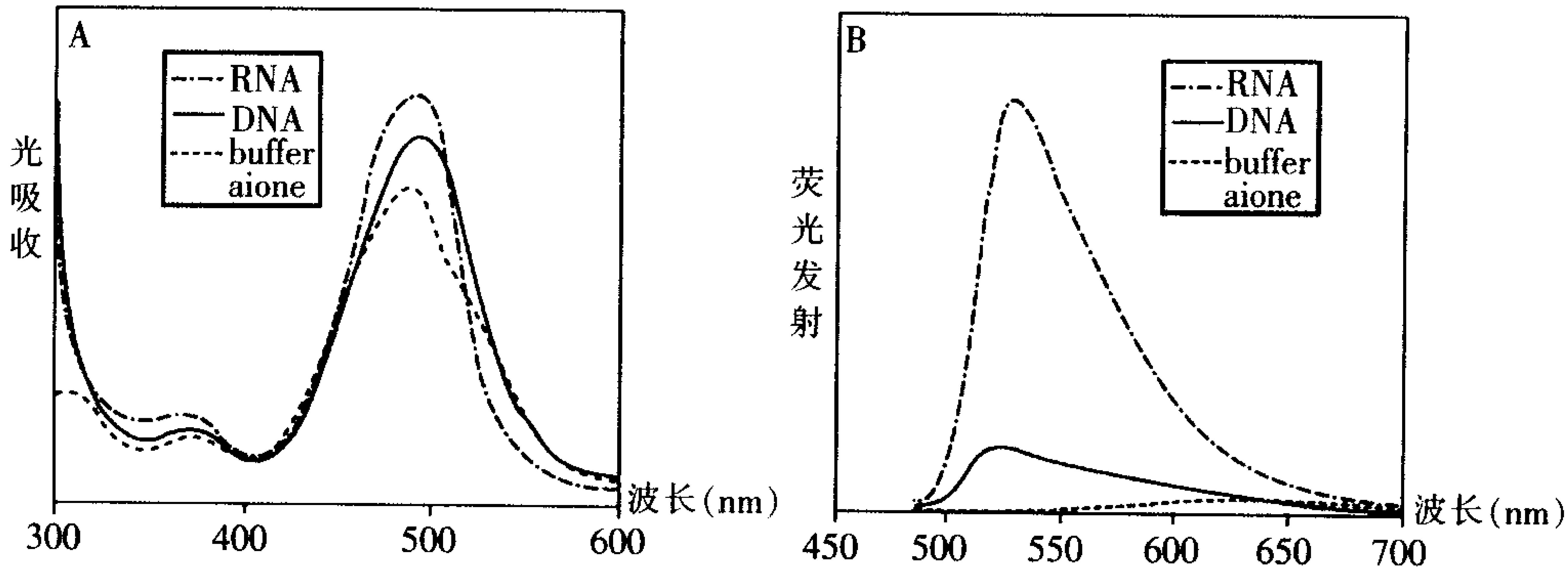


图 4-1　DNA 专一性 SYTO 染料的荧光激发情况

常用的 SYTO 核酸荧光探针,如表 4-6 所示。

表 4-6　常用的 SYTO 核酸荧光探针

探针名称	激发波长(nm)	发射波长(nm)	生物学应用
1. 蓝色荧光 SYTO 染料			
SYTO 40 blue-fluorescent nucleic acid stain	419	445	
SYTO 41 blue-fluorescent nucleic acid stain	426	455	
SYTO 42 blue-fluorescent nucleic acid stain	430	460	
SYTO 43 blue-fluorescent nucleic acid stain	437	464	
SYTO 44 blue-fluorescent nucleic acid stain	445	472	
SYTO 45 blue-fluorescent nucleic acid stain	452	484	
2. 绿色荧光 SYTO 染料			
SYTO RNASelect green-fluorescent cell stain	490	530	
SYTO 9 green-fluorescent nucleic acid stain	483	503	
SYTO 10 green-fluorescent nucleic acid stain	484	505	检测核酸
SYTO BC green-fluorescent nucleic acid stain	485	500	
SYTO 13 green-fluorescent nucleic acid stain	488	509	
SYTO 16 green-fluorescent nucleic acid stain	488	518	
SYTO 24 green-fluorescent nucleic acid stain	490	515	
SYTO 21 green-fluorescent nucleic acid stain	494	517	
SYTO 27 green-fluorescent nucleic acid stain	495	537	
SYTO 26 green-fluorescent nucleic acid stain	497	534	
SYTO 23 green-fluorescent nucleic acid stain	499	520	
SYTO 12 green-fluorescent nucleic acid stain	500	522	
SYTO 11 green-fluorescent nucleic acid stain	508	527	
SYTO 20 green-fluorescent nucleic acid stain	512	530	
SYTO 22 green-fluorescent nucleic acid stain	515	535	
SYTO 15 green-fluorescent nucleic acid stain	516	546	

续表

探针名称	激发波长(nm)	发射波长(nm)	生物学应用
SYTO 14 green-fluorescent nucleic acid stain	517	549	
SYTO 25 green-fluorescent nucleic acid stain	521	556	
3. 橙色荧光 SYTO 染料			
SYTO 86 orange-fluorescent nucleic acid stain	528	556	
SYTO 81 orange-fluorescent nucleic acid stain	530	544	
SYTO 80 orange-fluorescent nucleic acid stain	531	545	
SYTO 82 orange-fluorescent nucleic acid stain	541	560	
SYTO 83 orange-fluorescent nucleic acid stain	543	559	检测核酸
SYTO 84 orange-fluorescent nucleic acid stain	567	582	
SYTO 85 orange-fluorescent nucleic acid stain	567	583	
4. 红色荧光 SYTO 染料			
SYTO 64 red-fluorescent nucleic acid stain	598	620	
SYTO 61 red-fluorescent nucleic acid stain	620	647	
SYTO 17 red-fluorescent nucleic acid stain	621	634	
SYTO 59 red-fluorescent nucleic acid stain	622	645	
SYTO 62 red-fluorescent nucleic acid stain	649	680	

（二）吖啶橙(AO)

这是一种阳离子荧光探针，通过嵌入或静电吸引而与 DNA/RNA 相结合。当与 DNA 结合时，最大发射波长为 525nm；与 RNA 结合时，最大发射波长为 650nm。其重要作用有：

(1) 单链或双链 DNA/RNA 定性和定量对肿瘤的诊断、分类及预后判断有重要意义；

(2) 分析核酸内部的结构、分子结构及含核酸的细胞成分构象；

(3) 观察 DNA 凝胶电泳情况；

(4) 其他作用，如可标染胰岛细胞内含胰岛素的分泌型颗粒；对大肠杆菌的计数，对疟疾作快速诊断；作为胞内 pH 梯度显示剂，用来监测钠离子交换、钙离子诱导的质子梯度变化及在耐药性大鼠肝结节中质子泵活性。

（三）Hoechst 荧光探针

这是一种槽结合型 DNA 探针，其特点包括：

(1) 细胞毒性小；

(2) 偏重与 DNA 碱基中的 AT 碱基对结合，尤其是与 poly-(d(A-T))结合牢固，甚至可取代几种 DNA 插入子；

(3) 荧光强度和结合亲和力取决于 DNA 碱基对的构象和序列；

(4) 特异性强，专一性地与 DNA 结合；

(5) 分辨率高:借助于扫描显微镜,可在一百万个混合细胞中检测到一个目的细胞;

(6) 可被大多数常规荧光光源所激发,但波谱有较大偏移(激发波长为 345nm,而发射波长为 460nm),故适合于多重染色;

(7) 5-溴脱氧尿核苷(BrdU)与 DNA 结合,可使 Hoechst 探针的荧光淬灭,因而它可用于检测 BrdU 处理过的活细胞的增殖状态。

目前此探针的应用主要有:

(1) DNA 的定量检测,只是细胞增值活性良好的指示剂;

(2) 测定细胞数量,染色体分型,多参数分析及核型分型;

(3) 定量 PCR 扩增产物的量(即使单链引物过量也可);

(4) 区分 DNA 发夹构型中的平行区和反平行区;

(5) 根据判定细胞周期而把细胞群分类:G_1 和 G_2M 亚类;

(6) 在活体内判断此探针附近有无血管:探针进入血管内,靠近血管的细胞比远离此血管的细胞染色深;

(7) 追踪观察活体鼠卵原核变化,体内淋巴细胞的迁移,以及精子与卵子的结合位点;

(8) 检测细胞培养有无支原体的污染。

(四) DAPI 荧光探针

DAPI 荧光探针最早由 Dann 及其同事合成。它与双链 DNA 的小槽结合,尤偏向于 AT 碱基结合,也可插入到少于 3 个连续 AT 碱基对的 DNA 序列中。当它与双链 DNA 结合时,荧光强度增强 20 倍,而与单链 DNA 结合无荧光的增强(它与硫酸葡萄糖,SDS,多聚磷酸及其他多聚阴离子结合时,也有轻度的荧光强度增高)。它的荧光强度比 Hoechst 低,但光稳定性强于 Hoechst。DAPI 选择性地与 DNA 相结合,其特异性比 EB、PI 高。DAPI 荧光探针的主要应用有:

(1) 检测溶液中的单链 DNA 分子及单一细胞和叶绿体中的极微量 DNA(fg 极);

(2) 检测琼脂凝胶电泳中的双链 DNA,敏感性比 EB 高;

(3) 检测总 DNA、细菌 DNA 和噬菌体 DNA,借以判断果蝇胚胎发育阶段,细胞核型分型、DNA 的倍性等;

(4) 作为原位杂交的荧光复染剂;

(5) 检测细胞培养时有无支原体污染。

(五) 二氢乙锭荧光染料

二氢乙锭穿透入细胞胞浆内,与 DNA 结合后产生蓝色荧光。若进入的活细胞能使二氢乙锭脱氢氧化为乙锭,则乙锭可插入 DNA 链中发出红色荧光。其应用有:

(1) 分析吞噬细胞的呼吸爆发;

(2) 杀伤细胞或靶细胞的定量;

(3) 检测精子的活力;

(4) 检测发现多重耐药性癌细胞;

(5) 作为一种氧化还原型探针,用于球状体和鼠肿瘤中缺氧细胞的定位;

(6) 监测和筛选融合的杂交瘤细胞;

(7) 估测红细胞内寄生虫的活力。

(六) 三甲补骨脂素荧光探针

它属于光激活型核酸探针,能穿透细胞膜,插入双链 DNA 中。在 365nm 光照射下,与嘧啶共价结合。其应用有:

(1) 研究大肠杆菌细胞内 DNA 结构形态;

(2) 跟踪鼠成纤维细胞中 DNA 的修补;

(3) 评估范克尼贫血细胞对光敏治疗产生的致畸负效应。

二、非细胞透性核酸荧光探针

(一) 溴化乙锭(EB)和碘化丙锭(PI)探针

这两种探针不能透过活细胞进入细胞内,它们与核酸的结合特异性低,也很少或无碱基结合的偏向性;PI 比 EB 水溶性强;EB-DNA 结合物的荧光激发可引起 EB 探针的光漂白和 DNA 单链的断裂;EB 能与单链、双链和三链 DNA 结合,是检测 DNA 琼脂凝胶电泳最常用的荧光探针。EB 和 PI 的应用有:

(1) 监测多聚核小体的分子柔韧性;

(2) 测定 PCR 产物的量;

(3) 监测血中有无细菌的存在;

(4) 示踪脂质体与细胞融合情况:用脂质体包裹 EB,当脂质体与细胞或 DNA 融合才发出正常的荧光;

(5) 检测死亡或即将死亡的细胞的数量;

(6) 了解细胞内染色体局部状况、DNA 结构及膜完整性;

(7) PI 还可作为一种细胞蜕变示踪剂。

(二) PO-PRO,BO-PRO,YO-PRO 和 TO-PRO 荧光探针

这类探针是一类新的非细胞透性核酸荧光探针,其特点及应用有:

(1) 波谱情况独特:未与核酸结合时,荧光强度接近于零;

(2) 光稳定性好;

(3) 与双链 DNA 亲和力很高,但也能与单链 DNA、RNA 结合,不过荧光强度较弱,用于死细胞 DNA 定量;

(4) 发射波长范围窄,适于多重染色;

(5) 在溶液中与 DNA 结合很牢固,可定量检测溶液中的 DNA;

(6) 不进入活细胞,用于活细胞的膜完整性研究。

(三) 氨基放线菌素-D(AAD) 荧光探针

AAD 也是一种非膜透性荧光探针,它能选择性地与 DNA 的 GC 碱基相结合,并插入 DNA 中,其应用有:

(1) 与 DNA 结合后有波谱的偏移,发射波长高于 610nm,用于多重染色;

(2) 用于区分细胞处于细胞周期中的 G_0 期/G_1 期;

(3) 配合固定技术和致细胞通透技术,可同时定量 ADD 结合的 DNA 和荧光素抗体结合的细胞表面抗原。

(四) 9-氨基-6-氯-2-甲氧基吖啶(ACMA)荧光探针

ACMA 能选择性地与 DNA 的 poly-(d(A-T))相结合,并插入到 DNA 中,其应用有:

(1) 多重染色:大多数光源均可激发;

(2) 染色体素描:它在染色体 AT 富集区有较强的荧光,使其成为特殊的染色图形及"Q 带";

(3) 电位测定:ACMA 与膜结合表现为光依赖性和温度依赖性,且可与叶绿体内类囊体膜的阴性电荷稳定地结合,所以可测定电位;

(4) pH 值跨膜变化及质子易位活性测定,因为 ACMA 可自我淬灭。

(五) POPO,BOBO 和 YOYO, TOTO 荧光探针

它们均不能进入细胞内,是一种新型超敏感型二聚体核酸荧光探针,它们共同特点有:

(1) 高度敏感型:如 TOTO-1 能测到琼脂凝胶中 4pg 的双链/单链 DNA 条带,且不影响电泳迁移率。有报道称 YOYO-1 甚至比 TOTO-1 还要敏感;

(2) 与 DNA 的结合为可逆性;

(3) 有抗转化效应:即放置一段时间后,它们与 DNA 结合后复合物转化为非标记的 DNA 的转化率低。如当未标记的双链 DNA 过量 100 倍,TOTO-1/DNA 复合物在其中放置 10h,它仅有 15%~20%转化为非标记 DNA。因此,抗转化效应可应用于凝胶中同一条带多种 DNA 样品的检测;

(4) 它们的荧光波谱特性与相应的单体波谱相似,且未与 RNA/DNA 结合前,都不发荧光。目前,通过改变其花氰单体上的芳香环及碳原子数量,可合成一系列超敏探针,这一系列探针仅有激发光谱和发射光谱的改变,而无其他特性的改变。如 YOYO-1 491/509 探针即有一个碳原子,激发波长和发射波长分别为 491nm 和 509nm。

(六) 乙锭二聚体和吖啶-乙锭二聚体荧光探针

它们也均不能穿透活细胞膜进入细胞内,乙锭二聚体和吖啶-乙锭二聚体与 DNA 结合后,荧光强度增强了 30 倍以上。它们的特点和用途如下:

(1) 比 EB 结合 DNA 的亲和力高,因而敏感性高,如 Ethd-1 可检测到聚丙酰胺凝胶上 30pg 的 DNA(配合共聚焦荧光扫描仪);

(2) 对 DNA 碱基对的结合有偏向性,偏向于插入双链 DNA 链中的 AT 碱基对中,因此配合比例成像技术,可用来测定固定的单个细胞染色体中 AT 碱基的含量;

(3) 鉴定死亡细胞,它们不透过活细胞的膜,但可透过死细胞膜。

(七) 吖啶二聚体荧光探针

它不能穿透细胞膜,与核酸的 AT 富集区有极高亲和力,但只有 4 个连续 AT 碱基对存在时,才能结合并发出蓝绿色荧光,且荧光的强度与 AT 碱基对含量的 4 次方成正比。它用于鉴定连续 AT 碱基对等。

(八) 一叠氮乙锭、二叠氮乙锭和 9-叠氮吖啶

它们不能透过活细胞膜,均需要在光分解后,才能与核酸共价结合,故又属于光激活性核酸荧光探针,其应用有:

(1) 示踪 DNA 上药物的结合位点;
(2) 示踪 DNA/RNA 上的乙锭结合位点;
(3) 测定造血细胞表型、功能及在细胞周期中所处的位置;
(4) 修饰质粒 DNA;
(5) 使酵母发生线粒体突变;
(6) 测定缓慢的再定向运动:叠氮乙锭标记的 DNA 有光漂白性;
(7) 鉴定死细胞,如一叠氮乙锭用于活细胞和死细胞的区分。

根据荧光探针的性质及应用范围列出的常用核酸荧光探针,如表 4-7 所示。

表 4-7 常用的核酸荧光探针

探针名称	激发波长(nm)	发射波长(nm)	生物学应用
9-amino-6-chloro-2-methoxy acridine	430	474	DNA,染色体 Q 带,AT-特异 DNA
Acridine ethidium heterodimer	492	627	富含 AT-DNA 和总 DNA
Acridine orange	490	530,640	区分和测量单、双链核酸(插入双链核酸和磷酸基团结合)
Acriflavine Feulgen	455	515	DNA
Adriamycin	480	555	插入 GC-特异 DNA,染色体 D 带,Y 染色体,抗瘤
7-Amino AMD	555	655	插入 GC-特异 DNA
Auramine O-Feulgen	460	470	DNA
BAO-Feulgen	380	470	DNA
Bis-ANS	385	500	抑制 RNA 聚合酶
Carminomycin	470	550	抗瘤

续表

探针名称	激发波长(nm)	发射波长(nm)	生物学应用
Chromomycin A3	450	570	G-C 特异 DNA,抗瘤抗生素
DAMA	467	549,617	RNA 和 DNA
DAPI	372	456	AT-特异双链 DNA,染色体 Q 带,区分酵母线粒体和核 DNA,细胞中病毒和菌质,DNA 感染
Daunomycin	475	550	DNA,染色体 Q 带,Y 染色体
Dihydroethidium	370,525	420,605	DNA(在活细胞中被氧化成溴化乙锭)
$DiOC_1(3)$	482	510	核酸
DIPI	355	450	AT-特异 DNA,染色体 Q 带
Ellipticine	450	525	RNA 和 DNA(插入双链核酸)
Ethidium bromide	545	610	RNA 和 DNA(插入固定细胞的双链核酸)活性分析
Ethidium monozide	510	600	RNA 和 DNA(插入双链核酸)活性分析
Hoechst 33258	365	465	AT-特异 DNA(活细胞和固定细胞),染色体 Q 带,DNA 合成,5-BrdU 结合到 DNA 后淬灭荧光检测,细胞中病毒和菌质 DNA 感染
Hoechst 33342	355	465	AT-特异 DNA(活细胞和固定细胞),可以很快从某些细胞中流出而防止和 DNA 的结合
Hydroxystilbamidine	360	450,600	AT-特异 DNA(出现双峰)和 RNA(只有 450mm 发射峰可见)
Mithramycin	395	570	GC-选择性 DNA,抗瘤抗生素
Nogalomycin	480	560	DNA,抗瘤
Oxazine750	690	699	DNA(用氦氖激光器激发)
Proflavine	455	515	核酸,AT-特异 DNA
Propodium iodide	530	615	RNA 和 DNA(插入双链核酸)
Pyronin Y	540	570	活性分析
Quinacrine dihydrochloride	436	525	RNA
Quinacrine mustard	385	525	AT-特异 DNA,染色体 Q 带,Y 染色体
Rhodamine 700	659	669	染色体

续表

探针名称	激发波长(nm)	发射波长(nm)	生物学应用
Rhodamine 800	700	715	AT-特异 DNA,染色体 Q 带
Rubidazone	480	560	DNA(用氦氖激光器激发)
RuDIP(tris-(4,7-dephenyl phenanthroline) ruthenium)	543	480	DNA(用氦氖激光器激发) 抗瘤
Thiazole orange	509	533	金属络事物,识别 DNA
Meso-tetra(4-N0methylpyridyl) Porphine	436	655	核酸 核酸
4,5′,8-trimethylpsoralin	338	420	DNA
True Blue	373	404	插入双链 DNA 在紫外照射下共价连接到嘧啶上 AT-特异 DNA

第五节　其他荧光探针

一、D1 和 D5 多巴胺受体荧光探针

目前已知有 5 种多巴胺(D1～D5)的受体,其中 D1 受体与腺苷酸环化酶的激活有关,而 D2 受体与腺苷酸环化酶的抑制有关。目前,应用 D1 特异性拮抗物 SCH23390 及 D2 拮抗物 NAPS 或 D2 选择性拮抗剂 PPTH 标记上荧光基因,所制成的探针具有高度特异性和亲和性,可定位不同细胞的受体亚型。由于它们有一系列的最大荧光发射波长值,故在单一神经元上可同时标记多种探针,用于多巴胺受体亚型的分类与区分。

二、表皮生长因子受体(EGF)荧光探针

表皮生长因子是一种分子量为 6 045D 的含 53 个氨基酸的多肽激素,它可促进表皮及其多种细胞的分裂。当它的 N-末端氨基酸标记上生物素-XX、荧光素、四甲基罗丹明、BODIPY 时,所制成的荧光探针可应用于跟踪 EGF 受体的内吞作用计侧向运动。此外,生物素标记的 EGF 探针也用于 EGF 拮抗物的测定。

三、甘氨酸受体荧光探针

甘氨酸是哺乳动物中枢神经组织中的一种主要的抑制性神经递质。当其受体的拮抗物士的宁标记上 NBD 或 BODIPY 时，所制备的探针即可用于观察神经元上的甘氨酸受体局部分布情况以及侧向运动。

四、组织胺受体探针

组织胺标记上荧光素后，即可借助于荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜来观察细胞表面组织胺受体的分布及生理生化状况。

根据荧光探针的性质及应用范围列出的其他常用荧光探针，如表 4-8 所示。

表 4-8　其他常用荧光探针

探针名称	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)	生物学应用
1. 免疫细胞化学荧光团，结合物和外源凝集素			
Allophycocyanin(AP)	620	660	
Allophycocyanin cross-linked(AP-XL)	650	66	
AMCA(7-amino-4-methylcoumarin-3-Acetic acid)	350	450	
Bodipy(borondipyromethene difluoride dye)	505	515	
CT-120(coumarin 120 thiolactone)	345	410	
CT-339(coumarin 339 thiolactone)	350	420	
Coumarin 138	365	460	各种蛋白质、受体单糖、多糖
Dansyl chloride	340	578	的示踪剂
2,7-Dichlorofluorescein	513	532	
4′,5′-Dimethylfluoredcein	510	535	
5-DTAF (5-(4, 6-dichlorotriazinyl) aminofluorescein)	495	530	
Eosin-5-isothiocyanate	524	548	
Erythrosin-5-isothiocyanate	535	558	
FTIC(fluorescein-5-isothiocyanate)	490	520	各种蛋白质、受体单糖、多糖
Fluorescein anhydride(FA)	490	520	的示踪剂
3-HFT(3-hydroxyflavone thiolactone)	350	415	
Lucifer yellow CH	435	530	

续表

探针名称	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)	生物学应用
N-Methylanthranyloyl	350	440	
NBD(nitrobenzoxadiazole)	468	520	
Phycocyanin(PC)	620	650	
Phycoerythrin B(PE-B)	545	576	
Phycoerythrin R(PE-R)	495,545	576	各种蛋白质、受体单糖、多糖的示踪剂
Princeton red anhydride(PRA)	490	580	
RITC(hodamine B isothiocyanate)	570	595	
TRITC(tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate)	541	572	
XL-Allophycocyanin(XL-AP)	620	660	
XRITC(tetra-N-cyclopropyl-thodamine Isothiocyanate)	578	604	
2. 蛋白质探针			
Acridine orange	490	530	热 TCA 提取后蛋白质的酸性基团
Ammonium 7-fluoro-2-oxal,2-diazole-4- sulphonate	380	515	巯基
ANS(8-anilino-1-Naphthalenesulphonic acid)	385	485	蛋白质(疏水探针)
Anthracene-9-carboxaldehyde-carbohydrazone	393	456	醛基探针
Bis-ANS(1,1′-Bi(4-anilino)	385	500	蛋白质
naphthalene -5,5′-disylphonic acid)	420	520	DNA 提取后 pH 8.0 组蛋白,pH 2.8 全蛋白
Brilliant sulphoflavine	385～390	465	巯基(-SH)
CPM(N-(4,7-dimethylamino-4- methyl-coumarin-3-yl)maleimide)	430		氨基酸探针
DAB-ITC(4-N,N-dimethylamino-ben- zene-4′-isothiocyanate)	335	500	组蛋白和精蛋白
Dansyl chloride(5-dimethylamino-1-	522	551	pH 10.0 或更高时组蛋白
naph-thalene-sulphonyl chloride)		520	蛋白质
Eosin	490	510	醛基探针
FITC(fluorescein-5-isothiocyanate) Fluoral-P(4-amino-3-pentene-2-one)	410 380	460	细胞表面蛋白质(伯胺结合产生荧光络合物)

续表

探针名称	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)	生物学应用
Fluorescamine	490	520	酯酶
FDA(fluorescein diacetate)	B	Y	蛋白质的巯基
Fluorescein mercuric acetate	410～415	475,525	生源一元胺
Foamaldehyde-induced monoamine			
Fluorophores	420	500	醛基探针
9-Hydrazine acridine	350	460	蛋白质
"Long name"(stilbene disulphonate	B	Y	蛋白质的巯基
acid derivative)			
Mercury orange (4-chloro-mercuryhenyl-zao-2-naphthol)	450～490	600	谷胱甘肽(非水溶剂),蛋白质巯基
MUA(4-methylumbelliferone acetate)	430	540	酯酶
OPT(o-phthaldehyde)	UV	B	pH 7～9 多元胺
Primuline	365	455	蛋白质
RITC(thodamine B-isothiocyanate)	570	595	蛋白质
Salicoyl hydrazine	320	400	醛基探针
SBD-C1(4-chrolo-7-sulphobenzo-furan, ammonium salt)	380	510	巯基
Sulphorhodamine 101	576	602	蛋白质
XRITC(tetra-N-cyclopropyl-Rhodamine isothiocyanate)	578	504	蛋白质
3. 细胞活性探针			
Acridine orange	490	530,640	活细胞中为绿色单体;死细胞中为红色聚合体
Calcein AM	495	620	活体探针
Calcofluor white M2R	UV	B	染色动物细胞,活植物细胞壁
5(6)-carbocyfluorescein diacetate	495	520	细胞活体探针(基于胞内羟基荧光素的产生)
Chrysophyosphine 2G	435	515	活体探针(类似于吖啶橙)
Dihydroethidium	370,535	420,585	氧化成溴化乙锭,在活细胞中使核发红光,细胞质呈蓝色

续表

探针名称	激发波长(nm)	发射波长(nm)	生物学应用
Dihydrorhodamine 123	320	-	氧化成罗丹明 123,可染线粒体
Ethidium monoazide	460	600	死细胞探针,固定细胞
FDA(fluorescein diacetate)	490	520	细胞活力探针(可与 PI 结合使用)
Fluorescein	490	520	通过测量荧光的各向异性,检测蛋白质结合染料的荧光去极化
Fluorescein digalactoside	490	520	检测半乳糖苷酶基因的活性
FluoroBora T	470	590	活体探针
PI	470	615	染膜有损伤的死细胞
Pyronin Y	540	570	活体探针(线粒体)
Rhodamine 123	510	534	活体探针(线粒体)在癌细胞和精子中聚集,区分周期细胞和非周期细胞
4-acetamido-4-isothiocyanatostilbene-2,2′-disulphonic acid	350	420	活体探针
Vita blue dibutyrate-14	524	570	活体探针

注:表中激发波长和发射波长栏中:B 代表蓝色光,UV 代表紫外光,Y 代表黄色光

第五章 活体荧光材料——绿色荧光蛋白(GFP)及其衍生物

近年来广泛应用的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)能够自发地发出荧光,它是第一个由生命自我复制、表达,并能按照设计"自动"标记靶蛋白的特异性荧光探针。

绿色荧光蛋白(GFP)是海洋生物水母(aequoria victoria)体内的一种发光蛋白。最早是从华盛顿维多利亚水母体内克隆得到的。GFP 蛋白本身具有发光功能的荧光基团,无须特殊的辅助因子或其他蛋白的参与。

在近几年的生命科学研究中,GFP 已成为跟踪活组织或活细胞内基因表达及蛋白质定位标记物,这一方法已日益成熟,成为基因转录调控、时相表达、蛋白质定位、转基因动物、细胞骨架等研究的有效手段。GFP 在组织中表达产生内在的荧光,从而可以标记一些正常的细胞学过程,再借助一些高分辨率的显微荧光光学仪器就可以监控这些动态过程。

一、发现绿色荧光蛋白

1962 年 普林斯顿大学的科学家 Osamu Shimomura 和 Frank Johnson 到华盛顿州做海洋生物取样调查,收集了不少太平洋水母的样本,他们试图了解海中多管水母为何具有发出生物荧光(bioluminescence)的特性。在随后的研究中,他们发现水母之所以发出生物荧光,与一个名为 Aequorin 的蛋白有关。由于水母整体发光及提取的 Aequorin 蛋白颗粒都是呈现绿色,故将这种蛋白命名为绿色荧光蛋白。后来在纯化 Aequorin 蛋白的过程中,他们又发现了一个在 Aequorin 蛋白周围的特别蛋白质(companion protein),这种蛋白质在紫外光(UV)的照射下,会发出高强度荧光绿,他们就依照这个特性,将它们一并归类为绿色荧光蛋白,即 GFP。

GFP 的独特之处在于它的受激发无种属特异性,产生荧光无需底物或辅助因子,并且与 GFP 融合表达的蛋白质在细胞内仍能发挥正常功能。

现已证实,GFP 是生物发光过程中能量转移的最后受体,可接受来自动物体内荧光素酶-氧化荧光素激发态复合物或转移钙依赖光蛋白释放的能量,从而发出绿色荧光。

随着分子生物学的发展,剪切 DNA 片段的技术成为生命科学研究的主要手段之一。在 GFP 被发现后的 30 年后,1992 年 Prasher 等人就是利用生物科技成功剪

切出一段神奇的基因体cDNA序列，该cDNA序列就是如何表达出水母Aequorea victoria体内的荧光绿蛋白质GFP的关键。而两年后的1994年，其他研究者发现，在其他生物体内表达的GFP不需要Aequorin蛋白或其他水母体内的要素相伴，也一样可以发出荧光绿。他们证明了在大肠杆菌(E. coli)或线虫(C. elegans)体内被表达的GFP在异于水母体内环境下，也可使大肠杆菌或线虫在UV照射下发出“绿光”。顿时，GFP名声大噪，于是这段GFP的cDNA序列便经常被应用到研究标记基因表达的追踪上，在分子生物学的研究中大放“绿光”。

二、绿色荧光蛋白的结构

绿色荧光蛋白GFP是酸性，呈球状，分子量为27k～30kDa，含238个氨基酸的单体。来自不同的动物体内的荧光蛋白的结构、性质不尽相同。目前研究的较为深入的是来自多管水母科(aequoria)和海紫罗兰科(renilla)的绿色荧光蛋白，即Aequoria GFP和Renilla GFP。两种GFP有不同的激发光谱，Aequoria GFP在395nm具有最高光吸收峰，肩峰为473nm；Renilla GFP在498nm具有强烈光吸收，肩峰为470nm。两种GFP发射光谱基本相同($\lambda max=508\sim509nm$)。这说明两种蛋白质含有相同的生色团。

1996年，Yang和Ormo两个研究小组分别独自发表有关绿色荧光蛋白GFP立体结构的成果，进一步揭开“绿光”的秘密。原来GFP像是一个灯笼，有一个圆桶的外壳，保护中心发光的荧光绿光芯。所有的GFP都有一个由三条氨基酸链组成的内在荧光基团。从结构上来看，GFP的折叠方式非常特殊，11条β桶状结构(β-barrel)绕成一个圆柱体，一条α螺旋(α-helix)缠绕在圆柱体的轴位置，生色团附在α螺旋上，包埋于中心。由于GFP具有独特的β罐结构，因此，它表现了以下独特的特性：

(1) 性质稳定，不易变性；

(2) 生色团的光谱特性与它的包埋方式相关；

(3) 由于GFP的β罐表面两端结构有一定的柔性，因此GFP的独特三维结构不会被融合蛋白破坏。绿色荧光蛋白能与多种蛋白质的N末端或C末端融合，而不失去天然蛋白质的特性。

GFP的生色团是GFP发出荧光的物质基础。GFP的生色团位于氨基酸序列64～69位的六肽内。一般来说，蛋白质犹如一个由20种不同花色的珠子串成的结构。每一个珠子(即蛋白质的基本单位——氨基酸)的特性不同，在三维空间或化学环境中的互动影响中蛋白质最终被折叠成型。GFP的第65、66、67个氨基酸分别是丝氨酸、脱氢酪氨酸、甘氨酸(serine-tyrosine-glycine)，是三个关键性珠子，它们通过共价键形成的对羟苯甲基咪唑环酮是一个独特的、相当稳定的环状三肽结构(如图5-1所示)，是构成GFP生色团的核心。生色团不偏不倚地落在被保护的α-Helix的中间，也就是说它们位于整个绿色荧光蛋白质GFP灯笼内的中心位置。这与灯笼中

的光源大多放在灯罩正中央，才能最有效地进行照明的道理是一样的。

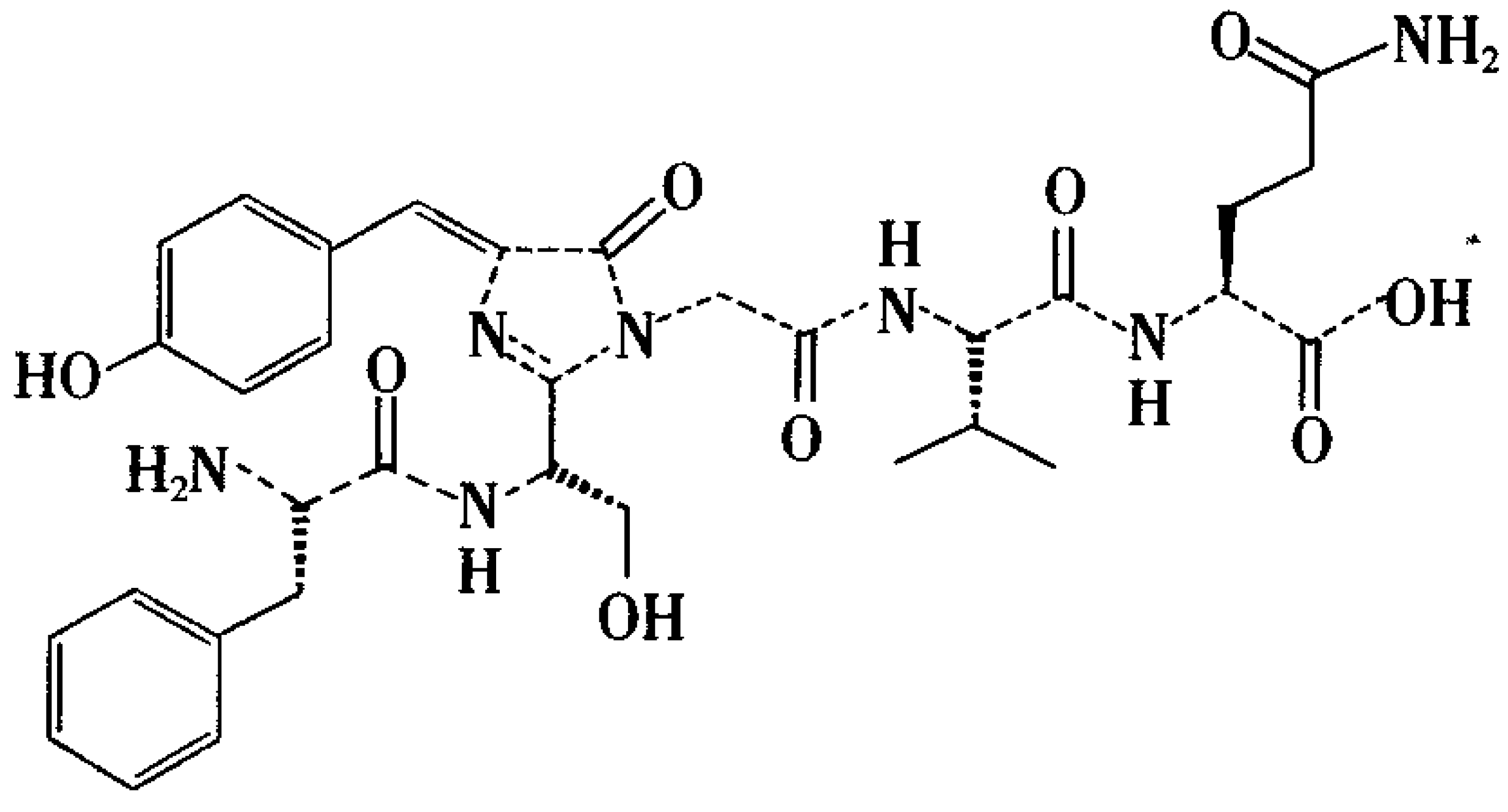


图 5-1 GFP 中环状三肽结构和附近序列

目前，GFP 生色团的形成机制尚不清楚，有推测认为其必须经过氧化脱氢步骤。

三、绿色荧光蛋白的特性及优点

（一）特性

1. GFP 的光谱特性

GFP 须在 UV 激发下才会发出绿色荧光，其最大激发波长在 460～490nm 之间。

GFP 具有相当明亮和稳定的发光基团，能够在用单纯的分子生物学方法的结合下发出强烈的可见荧光。GFP 吸收光的波长（即激发光波长）最高峰值在 479nm 处。当激发波长为 479nm 时，其绿色荧光发射光波谱为 500～550nm，其中最高峰值在 509nm 处，如图 5-2 所示。在 540nm 处伴随一小峰。因此，内源性荧光基团在受到紫外光或蓝光激发时，均可发出绿色荧光。其荧光性质一般较为稳定，仅在少数实验中发现其有淬灭现象。其发生的荧光无种属的依赖性，操作简单方便。可观察基因对转染细胞的形态、功能、细胞周期等的影响。

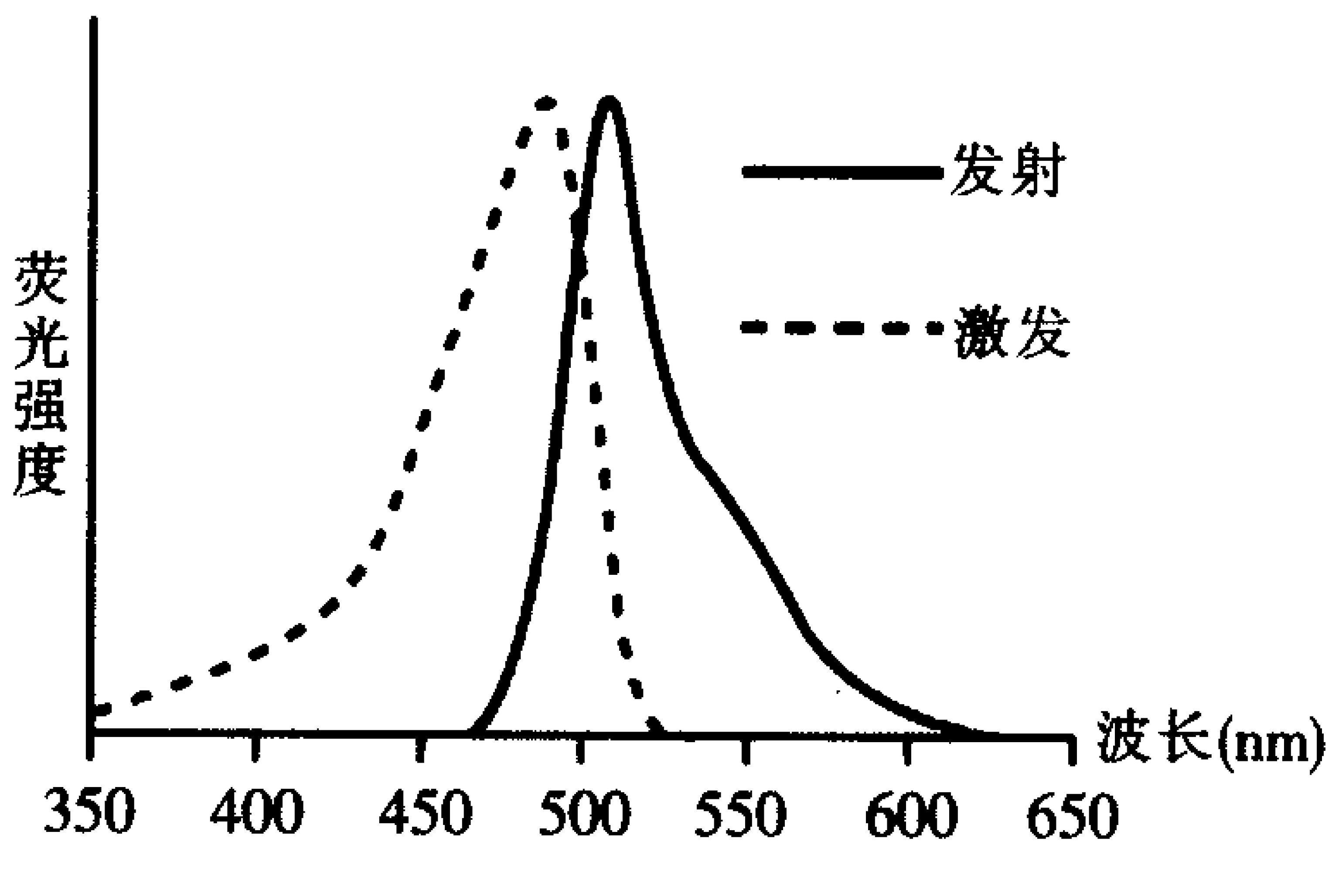


图 5-2 GFP 的激发光谱和发射光谱

2. GFP 的分子量小

GFP 大约 20kDa，其融合蛋白不影响结合蛋白的生物学功能，转染的细胞可继续传代。据此，GFP 基因可用作一种直观、方便和有效的报告基因。由于 GFP 是由一小段 DNA 序列所编码，因此易于操作和构建各种各样的融合体，甚至于更小的 GFP 多肽片段仍能保持活性。目前，将 GFP 与细胞内的特定蛋白构建成融合蛋白基因，当融合蛋白在细胞中表达时，使特定蛋白得到荧光标记。GFP 在任何活细胞

中(原核/真核细胞及病原菌)都表达,因而,作为活细胞的分子探针,GFP 连接上目的基因后转染细胞,使用荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜等仪器便可观察分析目的基因的生物学功能与特性。

随着对基因表达调控、蛋白质在活细胞中自然状态下变化的深入研究,人们对报告基因的要求越来越高,GFP 的发现及在研究中的应用,不仅满足了这一迫切需要,而且彻底改变了过去的研究方法。GFP 定位与免疫组化技术定位是目前广泛应用的蛋白质定位方法,但 GFP 定位比免疫组化技术定位具有更多的优点。免疫组化步骤繁杂,检测的是固定后死细胞内的情况,尤其易受抗体质量的影响,若用免疫组化方法定位新的基因,首先必须获得基因编码蛋白的抗体,通常采用细菌表达方法表达纯化该基因的编码蛋白,或者选择合适序列合成多肽,然后制备抗体,但表达纯化蛋白质及如何选择合适序列合成多肽本身就是一个难题,且抗体制备周期长,纯化困难,多肽多阳性信号干扰强,常常难以达到理想的效果。绿色荧光蛋白作为体内直接观察蛋白质分布情况,同时可监测两个或多个基因转录变化的具体发生时间。

在激光扫描共聚焦显微镜定位、定量监测细胞的 GFP 研究中,还往往辅助以其他荧光探针,即进行双探针标记或多探针标记,以定位出细胞核、细胞浆、细胞器及染色体等。这时,应注意防止各荧光探针之间的光谱交叉的干扰。例如,在用 DAPI 与 GFP 双标记的细胞中,用 351nm、364nm 紫外光激发时,DAPI 的荧光会干扰 GFP 的绿色荧光。这种情况下排除干扰的方法参见本书第二章第五节的介绍。

(二) GFP 的优点

(1) GFP 是一种可溶性蛋白,性质稳定,高温处理、甲醛固定、石蜡包埋、酸、碱等对荧光性质无明显影响。稳定纯化的 GFP 蛋白能在 65℃,pH 值 11,1%的 SDS 和大部分的蛋白酶的环境中保持荧光性数小时。

(2) 荧光基团能够利用普通的分子生物学工具简单加工到各种蛋白质的序列上,进而在各种难于甚至不能进行显微注射的细胞类型和组织范围内表达荧光,荧光基团相当明亮。

(3) 荧光的表达不需要花费固定的时间,也无需组织加工的步骤。

(4) 由于不存在免疫试剂的部分或不完全进入的问题,GFP 比免疫细胞化学方法可靠得多。

(5) 由于 GFP 及其多种突变体具有不同的光谱,因此可以对蛋白质进行共标记,并能对多重转基因细胞进行快速地分辨。

(6) 表达 GFP 融合物的细胞能够在生活状态进行实验和检测。GFP 作为报告基因与目的基因融合后对目的基因的结构和功能无影响,大量表达对细胞也无毒性,在细胞内仍能发挥正常的功能,细胞仍可连续传代培养,可对活细胞进行实时定位观察,这常被用于研究细胞内蛋白质的转运、相互作用及其他一些动态变化,这是普通的荧光染色或免疫荧光所无法做到的。

鉴于以上的各种特点,GFP 就成了一个极好的体内原位可检测蛋白质-蛋白质

间相互作用的报告分子，是非常优秀的实验标记物，它能够同多种分子生物学实验技术相结合，具有广泛的应用价值。

四、荧光蛋白的新进展

自从发现 GFP 后，人们继续寻找新的荧光蛋白。为获取光谱不同的荧光蛋白的基于 GFP 的突变研究也是近年来的研究热点之一。

(1) DsRed：是在 Discosoma 珊瑚礁中发现的橙红色荧光蛋白，其第二激发光谱吸收峰在 553nm 处，恰好超过叶绿素 b 的激发光谱吸收峰，克服了 GFP 的缺陷。DsRed 对植物生长发育无负面影响。

(2) 我国研究人员在“863 计划”资助下，首先从厦门水域大型多管水母中获得了新的 GFP 基因和发光蛋白基因，这是国际上除最早报道的维多利亚水母的 GFP 基因外的第二种水母野生型 GFP 基因，其在基因组结构上与原型序列有很大差别，氨基酸的同源性约 80%(已报道的其他 4 株野生型 GFP 的氨基酸同源性在 98%左右)，而二者的荧光光谱较为相近，从而为新型 GFP 的突变筛选提供了新的材料。在厦门 GFP 基因基础上通过盒式突变、DNA shuffling 等方式，从近 6 000 个突变克隆中筛选到了 5 株新 GFP 突变型，其中一株的发射光谱接近于橙色，这一颜色的荧光蛋白迄今仍未见有报道。

该研究还利用绿色荧光蛋白(GFP)变异体间的荧光共振能量转移(FRET)现象，筛选出合适的能量供、受体对，首先证实了抗体可介导 GFP 间的 FRET 的发生。将配体与供体分别与同一段艾滋病抗原嵌合表达，获得同时具有抗原活性和荧光特性的双功能抗原，利用这对抗原对艾滋病毒抗体阳性血清进行检测，结果表明体系中 FRET 的强弱与抗体滴度呈线性关系，从而初步建立了一种新型均相荧光免疫检测系统，具有简便、快捷、易于自动化的明显优点。

该研究获得了具有自主知识产权的多种 GFP 基因，其中几个基因较国外现有同类基因具有更加广泛的适用性，从而为今后广泛深入开发利用这一革命性标记分子奠定了坚实基础。已经初步建立的基于 GFP 的能量传递的均相荧光免疫检测体系显示了其可行性，快速、简便的特点使其具有极大的开发应用潜力，其所涉及的思路及方法目前世界上还未见任何相关报道，有望成为价值巨大的基础性专利，经 863 专家组验收认为达到国际先进水平。

(3) 随着新型绿色荧光蛋白(GFP)的不断开发，新型 GFP 以更亮、更方便的特性，极大地推进了基因/蛋白发现及功能分析。Stratagene 的升级版 Vitality hrGFP Ⅱ 绿色荧光蛋白比增强型绿色荧光蛋白(EGFP)更明亮、毒性更低，成为哺乳动物细胞相关研究的最佳选择。无论是哺乳动物细胞总的基因表达，转染效率检测，或目的蛋白定位，这种明亮的绿色荧光蛋白都能非常方便地用荧光显微镜或流式细胞计数法进行观察和检测。

Vitality hrGFP Ⅱ 是第二代人源化 Renilla reniformis 绿色荧光蛋白(hrGFP)。与 EGFP 相比,hrGFP Ⅱ的激发和发射光谱要窄得多,因此更易被检测。已经证明,经过对原来的 hrGFP 进行随机突变筛选得到的 Vitality hrGFP Ⅱ 在各种细胞中均比第一代 hrGFP 和 EGFP 更亮;而且,经改进的载体骨架也使 hrGFP Ⅱ载体更适合用于制备稳定细胞系。

hrGFP 的稳定性和毒性指标都明显比 EGFP 更佳,因此表达时间和细胞传代数均获得更好的效果,也更能帮助构建稳定细胞系。

(4) 随时间变色的荧光蛋白——Fluorescent Timer。在知道了 11-stranded beta-barrel 蛋白结构的奥秘之后:需要绿光、红光、橙光或青光,利用 DNA 剪切术,荧光蛋白质工程可以根据要求,重组创意蛋白制作。Clontech 公司最新推出的 Living Colors Fluorescent Timer,是惟一的一种能随着时间的延长而由绿色变为红色的荧光蛋白报告基因,如彩图 1 所示(见彩页 1)。融合了 Fluorescent Timer 的热休克启动子的转基因 C. elegans 胚胎,在 33℃水浴中产生热休克现象。启动子活性在热休克恢复过程中得以检测。由 Chroma Polycroich 装置所获取的图像,再用 Meta Morph 软件进行分析。绿色和红色荧光若发生叠加,将呈现黄色。这种颜色可变的荧光蛋白为实时研究启动子的调控时效提供了可能:在活细胞或者活的生物体内,不但可以看到某个启动子什么时候、在什么位置开始启动基因的表达,还可以观察到它什么时候关闭表达。这在以前是不可能实现的,而且由于这种报告基因是荧光蛋白,这种监测可以直接进行而无需其他更多的步骤或辅助因子。

这种叫 Fluorescent Timer 的荧光蛋白是以前 Clontech 的红色荧光蛋白 DsRed 的突变型,在表达后大约 3h 内由绿色荧光变为红色荧光(Clontech 公司此前提供 4 种不同颜色的荧光蛋白,分别为绿色(EGFP)、青色(ECFP)、黄色(EYFP)、红色(DsRed),其中青色(ECFP)和黄色(EYFP)是绿色(EGFP)的突变型,而红色(DsRed)则为来源不同的另一种蛋白。只要检测红、绿光的比率(重叠时为黄色),就可以推测出这个启动子开启和关闭的时间,也就可以确定目的蛋白的表达时间和存在时间。2h 后出现绿色荧光,表明 hsp16-41 启动子开始表达,50h 后绿色荧光消失,表明启动子关闭。

Fluorescent Timer 不但让你在空间上确定启动子表达产物的位置,还可以让你看到在生长过程中启动子的活力随时间的变化。

Fluorescent Timer 以两种方式提供:一种是质粒 pTimer,方便用户将 Fluorescent Timer 报告基因切下来,克隆到用户自己的载体上;另一种是质粒 pTimer-1,一个没有启动子的载体,方便用户将待研究的启动子克隆到这个载体上,直接进行研究。

(5) GFP 的其他突变体。大多数 GFP 的突变体部分或者全部丧失了荧光,虽然它们与 GFP 相比并没有在吸收峰或发射峰上发生太大的变化。原因很可能是这些突变体引起了蛋白质的错误折叠,荧光基团形成的失败或者不完全的屏蔽使荧光

淬灭了。切割基因的尝试表明,在荧光丧失之前,GFP能经受从氨基末端切去一个残基,从羰基末端切去少于10或15个残基。于是通过碱基突变,制造出众多的GFP突变体,其中一部分的激发和发射光谱如表5-1所示。

表5-1　GFP突变体的发光效应

突变体	最大激发光波长(nm)	最大发射光波长(nm)
在65位丝氨酸位点的突变		
野生型	396,475	508*
S65A	471	504
S65C	479	507
S65L	484	510
S65T	488	511
在66位酪氨酸位点的突变		
野生型	396,475	508*
Y66F	360	442
Y66H	382	448
Y66W	436	485

注:* 为当激发波长为396nm或475nm时的最大发射光波长是508nm

除了GFP之外,还有克隆自珊瑚和海葵的红色荧光蛋白(red fluorescent proteins,RFP),以及在其他不同物种中发现的黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein,YFP)、青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein,CFP)、蓝色荧光蛋白(blue fluorescent protein,BFP)等。

绿色荧光蛋白GFP是一个非常有潜力的实验工具,同时我们也需要认真研究、考察它的运作机制和局限。虽然目前大多数的研究者都把注意力放在利用GFP探测基因表达和蛋白质定位上,但是建立在对蛋白质的理解基础上的GFP蛋白的重组工程化可能会有更多应用。与此同时,尖端影像技术的发展也能提高对标记了荧光蛋白的细胞活动观测的敏感度,为分子细胞生物学研究开辟崭新的视野。

目前,GFP已在生命科学、医学的研究中得到广泛应用,详细的应用内容见第二部分第七章、第十一章及第十二章。

第六章　最新型荧光材料——量子点

随着激光技术、光谱技术、显微技术、计算机技术以及荧光标记和荧光检测技术的飞速发展，结合多个学科探索光子学技术在生物分子研究及医学诊断与治疗中的应用，已成为国际上迅速发展的新领域。光子学技术在研究基因表达、蛋白质-蛋白质相互作用、疾病早期诊断、新药研究、药效评价等方面正在或将会发生重要作用。

近 20 年来，人们对荧光半导体纳米晶体的研究，逐渐从电子材料科学领域渗透到了生物医学的应用方面，并已取得了一些重大进展。荧光成像技术发明之后，对其清晰度、灵敏度和多功能性的改进，以及荧光探头和活细胞蛋白标记技术的发展，使人们对细胞内网络连接、信号传导和细胞与细胞相互作用的研究得以深入，然而，要阐明某一生命体所有蛋白质的相互作用及相互影响，确是一个巨大的任务。在解决这一任务的过程中，单分子研究技术无疑扮演着重要角色。而存在于细胞内的单分子，其周围环境十分复杂，这就需要目前用于细胞内研究的手段有实质性突破。在新的荧光成像技术探索的道路上需克服两大问题，一个是细胞在可见光区的自发荧光对标记分子所发出信号的掩盖，另一个是对所研究分子的长期荧光标记观察。这就需要一种能在近红外区（波长＞700nm）发射荧光的探针，而且这种荧光的探针的光稳定性要远高于现有的荧光团。在这一领域，量子点恰好符合要求。2005 年 X. Michalet等在《科学》中综述了目前量子点的合成、溶解和功能实现的机理以及量子点在细胞生物学和动物生物学中的运用。

量子点技术在细胞内单分子研究、高清晰度活细胞成像、长时程观察活细胞迁移、肿瘤靶向治疗和疾病诊断等方面，将发挥巨大的作用。

一、量子点的定义及物理特性

在半导体材料中，微小晶体通常被称作量子点（quantum dot，QD），又可称为半导体纳米微晶体（semiconductor nanocrystal），它是由几百或几千个纳米级颗粒构成的半导体材料，是一种由Ⅱ-Ⅵ族或Ⅲ-Ⅴ族元素组成的稳定的、溶于水的、尺寸在 2～20nm之间的纳米晶粒。在细胞内不能合成和组装。目前研究较多的是 CdS、CdSe、CdTe、ZnS 等。量子点独特的性质基于它自身的量子效应，当颗粒尺寸进入纳米量级时，尺寸限域将引起尺寸效应、量子限域效应、宏观量子隧道效应和表面效应，从而纳米体系具有与宏观体系和微观体系不同的低维物性，展现出许多不同于宏观材料的物化性质。

量子点从20世纪70年代开始就吸引了物理学家、化学家和电子工程师的注意。这种量子点可以把电子锁定在一个非常微小的三维空间内，当有一束光照射上去的时候，电子会受到激发跳跃到更高的能级。当这些电子回到原来较低的能级的时候，会发射出一定波长的光束。即当量子点吸收一个大于半导体带隙能量的光子的时候，会产生一个电子空穴对（也叫激子，exciton），与标准的荧光基团（standard fluorophore）相比，吸收明显处于较高能量水平，并且会产生一个较宽的吸收谱。由于纳米晶体比所谓的Bohr激发半径还要小，能量水平呈现量子化的特点，能量的大小直接取决于量子点的大小。一个激子的辐射重组（radiative recombination特点为较长的寿命）使得光子的发射处于一个窄的、对称的能量带，这是量子点和大多数短寿命普通荧光基团的又一个不同之处。长的荧光寿命使量子点在时间门探测（time-gated detection）方面和短寿命荧光基团的信号易于区别。晶体结构上的表面缺陷（表现为对于电子或者空穴暂时的"traps"）会阻止辐射重组。

单独的量子点颗粒容易受到杂质和晶格缺陷的影响，"trapping"和"untrapping"的交替会引起单分子水平间断的荧光闪烁，因此量子产率很低。解决方法是保护微粒的表面，防止其氧化或者发生其他化学反应，即用具有高的带间隙能量的材料形成外壳或者几层原子包裹纳米晶体核心，这样既可以使量子产率提高到近90%，又使量子点的光稳定性在数量级水平有较大的增强。目前已合成了多种核壳结构的纳米颗粒，如CdS/Ag2S、CdS/ZnS、CdS/$Cd(OH)_2$、ZnS/CdSe、ZnSe/CdSe、CdS/HgS、CdS/PbS等，以及多层结构的CdS/HgS/CdS。

单量子点可以用共聚焦显微镜（confocal microscopy）、全内反射显微镜（total internal reflection microscopy）或者基本的宽视野落射荧光显微镜（basic wide-field epifluorescence microscopy）来长时间观察跟踪。由于有一个巨大的吸收截面，对于双光子共聚焦显微镜，量子点也是一个很好的探针。而且，它们也可以和标准的染料（standard dyes）同时使用。这种量子点微小的体积赋予了它们非同寻常的特性。

量子点的很多特性使得它和普通的荧光基团有较大的不同，胶体半导体量子点（colloidal semiconductor quantum dots）是直径几纳米的单晶，尺寸和形状都由在合成过程的持续时间、温度、配体分子精确控制，这个过程也使量子点具有依赖组成和尺寸的光吸收、发射的特性。

量子点通常采用胶体化学方法在有机体系中制备，即用金属有机化合物在具有配位性质的非极性有机溶剂环境中生长纳米晶粒。这种方法具有制备方法简单、可制备的量子点的种类多、容易对纳米颗粒表面进行有机或无机修饰、多种手段控制粒径分布、改进纳米颗粒性能的方法多等优点。

量子点可以产生多种颜色的光，光的颜色取决于量子点的尺寸。研究人员已经能够制造出产生超过12种颜色荧光的量子点。从理论上讲还可以产生出更多的颜色。这样，当某个波长的激光对多种量子点进行照射激发的时候，可以同时观察到多个颜色，同时进行多个测量。

最常采用的量子点是硒化镉(CdSe)晶体。微小的硒化镉晶体可以通过二甲基镉和硒发生反应而生成。把这两种物质放在高温表面活化剂溶液中,表面活性剂分子可以防止增长的晶体进一步变大。一旦晶体达到了要求的大小,溶液会冷却下来,表面活性剂分子进一步覆盖住晶体的表面,阻止晶体变大。

二、量子点具有优良的光学特性

(1) 量子点的激发光波长范围很宽,不同大小的量子点可以由同一波长的光激发。

(2) 量子点具有较大的半径位移和狭窄对称的荧光谱峰,这样就允许同时使用不同光谱特征的量子点,而发射光谱不出现交叠,或只有很少交叠,使标记生物分子荧光谱的区分、识别变得很容易。

(3) 量子点的发射波长可通过控制它的大小和组成材料来“调谐”,因而可获得多种可分辨的颜色。

(4) 量子点比有机荧光分子要稳定,它可以经受反复多次激发,而不像有机荧光分子那样容易发生荧光漂白。

三、量子点的优点

(1) 多种颜色。颜色取决于量子点的大小,在同一激发波长下,可发出多种激发光,达到同时检测多种指标的要求。

(2) 荧光时间长。荧光时间较普通荧光分子延长数千倍,便于长期追踪和保存结果。

(3) 检测方便。使用最简单的荧光显微镜即可进行检测。

(4) 安全。细胞毒性低,可用于活细胞或体内研究。

(5) 应用范围广,可用于多领域和多仪器。

四、量子点技术在生物领域中的应用

量子点技术如果应用在电子设备中会非常困难,这就是为什么目前量子点的应用主要局限在生物研究领域的原因。作为一种最新型的荧光材料,它与传统的有机染料相比确实具有多种优势。其中最大的优点在于有丰富的颜色。单一种类的纳米半导体材料就能够按尺寸变化产生一个发光波长不同的、颜色分明的标记物家族,这是荧光染料分子根本无法实现的。此外,它激发光谱宽,且连续分布;发射光谱单色性好,且颜色可调;并能够承受多次的激发和光发射,有持久的稳定性;空间位阻小,适于单分子标记。因此,这些优异的光学性质使得量子点在生物化学、分子生物学、

细胞生物学、基因组学、蛋白质组学、药物筛选、生物大分子相互作用等研究中有极广的应用前景。

（一）量子点引入细胞的方法

在生物研究中所使用的量子点需要链接其他分子才能便于追踪特定的生物分子。1998年，有两个研究小组发现了如何把量子点同其他的分子链接起来的方法——即将量子点分别同生物素、尿素、醋酸盐和某种抗体链接起来，链接的这些分子可以指引量子点成功地到达要研究的特定的细胞结构或分子结构。

随着研究的不断深入，又发现其他多种分子可用于作量子点的导引物质，如核酸、细胞膜上的脂质、同载体蛋白质或载体糖联系紧密的蛋白质，还有一些药物也可以把量子点引导到特定细胞结构中去。

(1) 侵入性技术(invasive techniques)，如scrape loading、电穿孔、显微注射法可以对细胞进行量子点标记。

(2) 非侵入性的方法来标记细胞：

第一种方法依赖于细胞内吞作用的能力。哺乳动物细胞(Hela)或者Dictyostelium discoideum细胞(AX2)在400～600nm DHLA-capped量子点溶液中培养2～3h后，洗掉多余的溶液，将会发现量子点出现在许多小囊泡中。实验发现量子点是通过内吞作用进入细胞的。如果在4℃环境下培养细胞时，则需要很长时间(>6h)才能将细胞标记。一旦标记上之后，细胞的形态和生理在较长时间(6天)内不会受到影响，且标记十分稳定。甚至在更长的时间(12天)内，细胞标记都不会消失。

第二种方法不依赖于内吞作用。用非渗透性膜、氨基介导的耦联剂sulfo-NHS-SS-biotin将细胞表面生物素化(biotinylate)，然后用0.5～1μM抗生物素蛋白结合的量子点在4℃环境下培养10min，洗掉未结合的量子点。开始时，标记都在细胞表面，当在37℃环境下培养2h之后，大部分标记会存在于靠近核的囊泡里，在细胞膜表面还有一些残余的标记。而且，很明显有更多的标记正在从细胞表面进入细胞内，表明量子点是通过内吞作用进入的，而不是由于被动的细胞膜渗透作用进入的。由于细胞同时会将其表面的蛋白内吞入细胞，则表明量子点标记对于细胞的正常内吞作用没有害处。值得注意的是，这种方法允许对那些即使不能进行胞吞作用的细胞进行标记。

研究发现，运用非侵入性方法标记的细胞的生长发育等不受影响。对于无法用荧光指示蛋白标记的细胞，我们可以利用量子点来研究其行为。

（二）量子点技术为生命科学的研究提供了新的研究方法

1. 用作荧光标记物

量子点最有前途的应用是在生物体系中作为荧光探针，成为细胞内的荧光标记物，此方法现已可取代传统染色法。与传统的荧光探针相比，量子点纳米晶体的激光光谱宽，且连续分布，而发射光谱呈对称分布且宽度窄，颜色可调，即不同大小的纳米晶体能被单一波长的光激发而发出不同颜色的光，并且光化学稳定性高，不易分解。

量子点可与多种分子进行耦联，如 Protein A、抗体、链霉亲和素等，作为荧光探针，检测特定靶分子的分布和功能。从而在细胞器定位、信号转导、原位杂交、胞内组分的运动和迁移等研究中发挥巨大作用。

2. *用于检测活细胞里多个蛋白质的活动*

量子点可进行长时间、多分子同时检测。因为量子点受到光激发后发出一系列不同颜色(光谱)的光，且发射的荧光强度足以使光学设备检测到单独的量子点。加之量子点很稳定，一般在数个小时内可经受反复的激发，而光学特性不会有明显变化，假如两个分子之间可发生相互作用，则标记其上的不同的量子点就会互相靠近，那么在这一区域中的光谱就会发生变化，成为两个光谱的叠加，在合适的条件下，甚至可能发生能量转移，即受体量子点的荧光增强。如果将某一生物过程中有关生物分子标记上不同颜色的量子点，就可能实现对活细胞内部分子的监测，或实时观测配体—受体的相互作用。

对于活细胞，有两种方法进行特殊标记：第一种是将生物素化的一抗和细胞一起培养，洗过之后，用抗生物素蛋白结合的量子点标记；第二种是在培养之前，用重组 G 蛋白或者抗生物素蛋白将一抗和量子点结合。可以将不同种类的细胞或者蛋白同时标记，从而可以观察其在活细胞中的反应或者在整个生物体的原位。

3. *用于活体示踪*

量子点克服了传统标记物毒性高、易淬灭、光线穿透能力差的缺陷。通过与靶标的耦联，实现长时程观测活体生物的生理和病理进程以及活细胞内生物大分子间的相互作用。例如：利用量子点对单个氨基乙酸受体在活神经元(神经细胞)中的扩散过程的观察；在活体动物手术过程中，通过观察量子点发射的近红外荧光对淋巴结的确认等。

4. *用于生物芯片*

量子点色彩的多样性满足了对生物高分子(蛋白质、DNA)中所蕴涵的海量信息进行分析的要求。因为，现有的研究蛋白质与蛋白质相互作用的蛋白质芯片应用中，尽管芯片上有“海量”的蛋白质，但由于受目前荧光探针性能的限制，一次通常只能将一种(或很少几种)标记了荧光探针的蛋白质与芯片作用，并进行检测。要研究多个蛋白质就只能多次重复上述操作。如果在应用中引入了量子点则可以做到“海量”对“海量”。即可将欲研究的各种蛋白质用一系列不同大小、不同材料、光谱特性各自不同的量子点或量子点微粒标记，更重要的是可以用同一波长的光激发，从而可以同时检测所有标记的蛋白质与芯片上的蛋白质之间的相互作用。与现有的方法相比，检测效率要大大提高。

另外，将多聚物与量子点结合(镶嵌或包覆)形成聚合物微珠，这种微珠可以携带几种不同尺寸(不同颜色)的量子点。当这些微珠被照射后便开始发光，经棱镜折射后传出，产生几种指定密度的清晰线谱(条形码)，形成的标签数量可以达到几十亿种，可以附在不同基因序列组成的 DNA 分子上。将样品中的基因同已知的 DNA 序

列库进行比较，就可以找出在细胞和组织里的活性基因，所需要的就是简单地将检测样品的谱线与微珠库中的谱线对照并读取粘在样品上的 DNA 序列。因此，条形码标记在基因芯片和蛋白质芯片技术中的应用具有极其光明的前景。

5. 用于药物研究

量子点是筛选药物的工具。通常一种有效的药物为达到所需的药效往往要和数个不同的靶分子结合，同时要避开其他的一些靶位点以避免副作用。将不同颜色的量子点与药物的不同靶分子结合，可一次性检测药物的作用靶分子。假如一种药物上只展示出蓝色、浅绿色、绿色等药效所需作用的靶分子，同时不显示出橙色、黄色、红色这些代表副作用的靶分子，则说明已成功找到一种有效的药物。

6. 用于溶液矩阵(solution array)

将不同的量子点或量子点微粒标记在某种生物分子上，并置于溶液中，形成所谓溶液矩阵。生物分子在溶液状态下易于保持生物分子的正常三维构象，从而具有正常的生物功能，这是其优于平面芯片之处。

7. 用于医学成像

由于可见光最多只能穿透毫米级厚度的组织，而红外光则可穿透厘米级厚度的组织，因此可将某些在红外区发光的量子点标记到组织或细胞内的特异组分上，并用红外光激发，就可以通过成像检测的方法来研究组织内部的情况，达到诊断的目的。

由化学家和神经学科学家组成的研究小组正在考虑如何在神经传输物质研究中使用量子点，以便通过医学成像技术观察神经传输物质对大脑中脑细胞活动的调节作用。

五、量子点技术的安全性

尽管量子点已应用于细胞生物学的研究，对于研究细胞之间的联系非常方便和有效。但要将量子点大规模应用还需要解决一些问题，这些问题主要和量子点表面物质的化学性质有关。因为量子点的表层要抗氧化、能够在细胞内部的一定的盐浓度下保持稳定。同时，虽然量子点的多样性给研究带来了便利，同时也造成了一定程度的麻烦，即多种量子点的表层不一定能够粘附在研究对象的表层。

又因为量子点和其他所有纳米粒子一样，可能使人体健康存在潜在风险，所以量子点技术还存在一些局限性。首先，较高浓度的量子点对于胚胎发育有一定的影响；其次，在胞内实验时，对于未结合的量子点的去除也是一个比较困难的问题，这并不像细胞膜外标记实验那么简单；此外，量子点成像的分辨率较低。有报告说，水溶性富勒烯分子能造成黑鲈鱼大脑损伤，这一结论让整个纳米技术界为之惊骇。另外，对其他纳米粒子的类似质疑也存在，如树枝状纳米材料会造成渗透性破坏，甚至导致细胞膜破裂。

美国国家环境健康科学研究所环境毒物学部执行主任约翰·布彻尔说："纳米材

料的作用既不像粒子也不像化学品，它们的性质既是中间的又是独特的，对于这一点，我们刚刚开始去探究。”该研究所最近启动了针对量子点、二氧化钛纳米粒子以及巴基球等安全性的一系列研究。作为负责人的布彻尔介绍，研究将集中于三个问题：纳米材料表面的涂层和化学物质对粒子行经的身体部位的影响、纳米粒子的免疫特性和纳米粒子的毒理效应。

但在 2002 年，围绕量子点的安全性问题又有了新的进展。有报道说将磷酸微胶粒包被在量子点表面，具有液体表面覆盖层的纳米颗粒不仅对细胞没有了毒性作用，而且可维持数天不损失荧光。也有报道在活体动物中制成了可同时进行恶性肿瘤定位标记和成像的量子点株。将量子点标记的肿瘤细胞注射入大鼠体内。经过数周的仔细检查，在量子点标记的肿瘤细胞以及动物体内并未出现异常迹象。由此说明，量子点是比较安全的技术，至少在大鼠中如此。在研究中如使用多光子荧光显微镜，量子点可同时监测超过 36 种细胞，并且可应用于深层组织中。

尽管研究已取得一定的进展，但是将量子点影像技术用于人类的临床试验还需要数年的时间。因为人们对量子点的安全性仍存有疑虑。还有一些关键问题亟待解决。例如，在动物活体较厚的组织，如骨组织中，量子点技术如何发挥作用；经量子点标记的生物分子与人体自身的生物分子(以及细胞和组织)如何区别，等等。

六、量子点技术的发展前景

半导体量子点由于其独特的性质越来越受到人们的重视，其研究内容涉及物理、化学、材料、生物等多学科，已成为一门新兴的交叉学科。

合成各种尺寸的荧光纳米颗粒和荧光量子点纳米颗粒，通过表面修饰的方法使其表面具有生物活性与生物靶向性，利用纳米颗粒显著放大信号的优势，将其用于活体细胞和动物器官的基因表达和蛋白质实时在体光学成像研究；建立核酸切割过程、核酸磷酸化过程以及核酸连接过程的荧光监测方法，实现核酸—蛋白质相互作用的实时监测等，可望在生命活动的基本规律研究方面发挥重要作用。

光学标记技术是生物分子光子学的重要基础，它在研究基因表达、蛋白质—蛋白质相互作用、疾病早期诊断、新药研究、药效评价等方面正在发生重要作用。

量子点未来的发展方向是寻找到更多的微小晶体材料，及在量子点表面覆盖上一层导引分子膜。

如果未来这种量子点要在人类身体上应用，那就需要解决如何消除这些量子点的方法。

以量子点的生物功能光学成像研究为代表的纳米生物光子学研究将是近阶段的主要研究方向。

第㊁部分

荧光色素（探针）在细胞生物学中的应用

第七章　荧光技术在细胞凋亡研究中的应用

细胞凋亡一词源于希腊文，意思是“叶片从树枝上飘落”，最早由 Lockshin 和 Williams 在 1965 年提出。随后发现，细胞凋亡是一种由基因控制的主动的“自觉行动”，而非被动的病理性死亡，故又称细胞凋亡为“程序性细胞死亡”(programmed cell death，PCD)。细胞凋亡这个词指细胞程序化死亡所表现的生化和形态变化，其中包括细胞收缩、膜泡化、染色质浓缩和降解成小片段。细胞凋亡中的细胞经常降解成为膜包裹的凋亡小体，被巨噬细胞或邻近的细胞吞噬或消化，但不产生炎症反应。细胞坏死则是受某些外界因素的影响所导致的被动的细胞死亡过程，如高温、缺氧、营养不良及多种物理或化学性的损害因子，因此，也可以称之为“意外性细胞死亡”(accidental cell death)。坏死细胞的膜通透性增高，致使细胞肿胀，细胞器变形或肿大，早期核无明显形态学变化，最后细胞破裂。另外坏死的细胞裂解要释放出内含物，并常引起炎症反应。细胞凋亡与细胞坏死的主要差异如表 7-1 及图 7-1 所示。

表 7-1　细胞凋亡与细胞坏死的比较

区别点	细胞凋亡	细胞坏死
起因	生理或病理性	病理性变化或剧烈损伤
范围	单个散在细胞	大片组织或成群细胞
细胞膜	保持完整，一直到形成凋亡小体	破损
染色质	凝聚在核膜下呈半月状	呈絮状
细胞器	无明显变化	肿胀、内质网崩解
细胞体积	固缩变小	肿胀变大
凋亡小体	有，被邻近细胞或巨噬细胞吞噬	无，细胞自溶，残余碎片被巨噬细胞吞噬
基因组 DNA	可控降解，电泳图谱呈梯状	随机降解，电泳图谱呈涂抹状
蛋白质合成	有	无
调节过程	受基因调控	被动进行
炎症反应	无，不释放细胞内含物	有，释放内含物

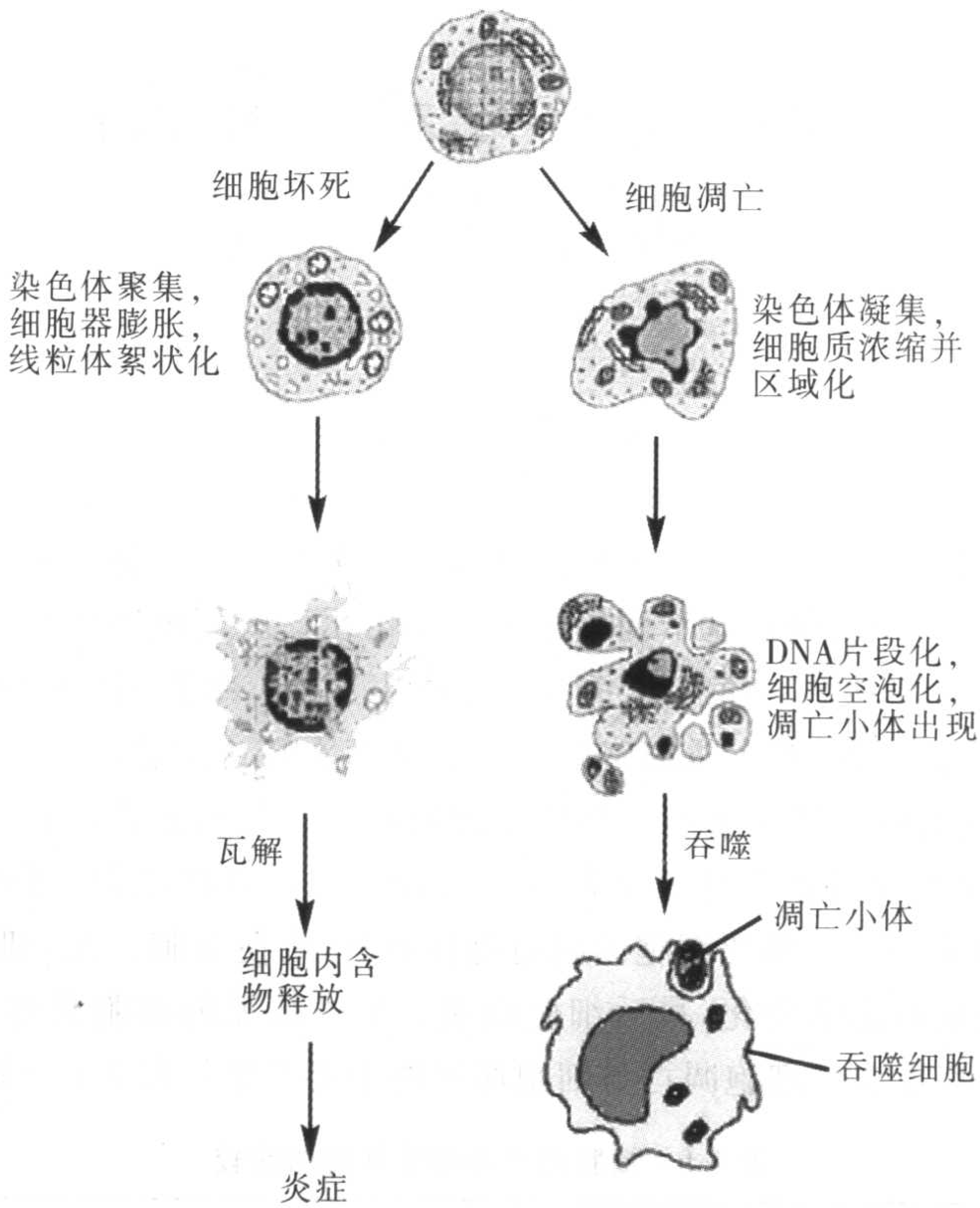


图 7-1 细胞坏死与细胞凋亡模式图比较

第一节 细胞凋亡及其基本通路

一、细胞凋亡

同细胞的发生一样，细胞也是注定要死亡的。细胞死亡的方式，目前认为可分为两大类型，细胞坏死(necrosis)和细胞凋亡(apoptosis)。细胞凋亡与细胞坏死是两种完全不同的细胞死亡形式，根据死亡细胞在形态学、生物化学和分子生物学上的差别，可以将二者区别开来。

高等真核生物的大多数细胞，在丧失生理功能或严重受损时，激活固有的细胞自杀程序而自灭。这一过程称为细胞程序化死亡，即细胞凋亡。

细胞凋亡是生物体内绝大多数细胞在一定的发育阶段中都会发生的一种正常的自然现象，是一种有秩序、有控制、有预定程序的死亡过程，它能及时有效地清除体内

出现的过量或有潜在危险性的细胞，用以保持体内各种类型细胞数目的平衡。这种平衡对于促进器官形成以及维持机体内环境的稳定是至关重要的。细胞凋亡与其他众多的细胞代谢过程一样，普遍存在于生物机体发生和发育的多个过程中，比如叶落归根，蝌蚪发育成为青蛙，人类胚胎期间手指与脚趾的形成等，都需要细胞凋亡的参与。如果正常细胞凋亡程序受阻，就会导致某些该死亡的细胞（例如，基因发生突变的细胞）不死，继而无限增殖，最终导致癌症或者其他疾病的产生。当然，过量的细胞凋亡，也会导致机体失衡，正常生命活动受到破坏，例如在艾滋病病毒的攻击下，不该死亡的 T 淋巴细胞如 CD4 阳性细胞大量死亡，从而使人的免疫力下降，引发艾滋病。

在 20 世纪 80 年代后期，随着现代分子生物学技术广泛地被运用到细胞凋亡的研究领域，科学工作者在这一领域取得了很多重大成果。这一期间，研究人员发现细胞凋亡参与了免疫系统中免疫细胞的发育、免疫调节及免疫应答等许多生理和病理过程，并在维持免疫功能上起着重要的调节作用。90 年代以来，细胞凋亡的研究更被推到了生命科学的最前沿，形成了一个几乎涉及生物医学所有领域的前沿学科。十多年来，细胞凋亡的研究在阐明细胞形态变化、结构与功能的关系、信号传导机制以及在发现与凋亡相关基因的工作中积累了大量的资料，这些知识使我们能更深入地了解凋亡与疾病的关系，并且更新人们对疾病发生的一些传统观念。由于细胞凋亡在生命活动中所具有的特殊重要性，2002 年的诺贝尔生理及医学奖授予了在细胞凋亡研究中做出创造性贡献的三位科学家，他们分别是英国科学家悉尼·布雷内（Sydney Brenner）、约翰·苏尔斯顿（John E. Sulston）和美国科学家罗伯特·霍维茨（H. Robert Horvitz）。

二、细胞凋亡的基本转导通路

目前细胞凋亡信号转导通路主要包括外在途径（extrinsic pathway，又称死亡受体凋亡途径）、内在途径（intrinsic pathway，又称线粒体凋亡途径）以及非 Caspase 凋亡途径（non-Caspase pathway），如图 7-2 所示。

死亡受体途径（death receptor pathway）主要是通过死亡受体来完成的，在细胞发生凋亡时，胞外的死亡信号分子或配体可通过与死亡受体的结合而传入细胞内，进而引发下游一系列凋亡步骤。死亡受体是一类跨膜蛋白，属肿瘤坏死因子 TNF 受体基因家族成员。目前发现至少有 5 种死亡受体在细胞凋亡信号转导中发挥作用，其中最典型的死亡受体有 Fas，DR4/5 和 TNFR1。实验证明，死亡受体信号转导过程主要依赖于信号蛋白所含有的一系列较保守的蛋白序列，这些序列可以识别并结合与其相同类型的结构域，包括死亡结构域 DD（death domain）和死亡效应结构域 DED（death effector domain）。

细胞表面的凋亡受体是属于肿瘤坏死因子受体（TNFR）家族的跨膜蛋白，它们

包括 Fas(Apo-1/CD95)、TNFR1、DR3/WSL、DR4/TRAIL-R1 和 DR5/TRAIL-R2。其配体属于 TNF 家族，目前已比较清楚的是 Fas 介导的细胞凋亡途径。

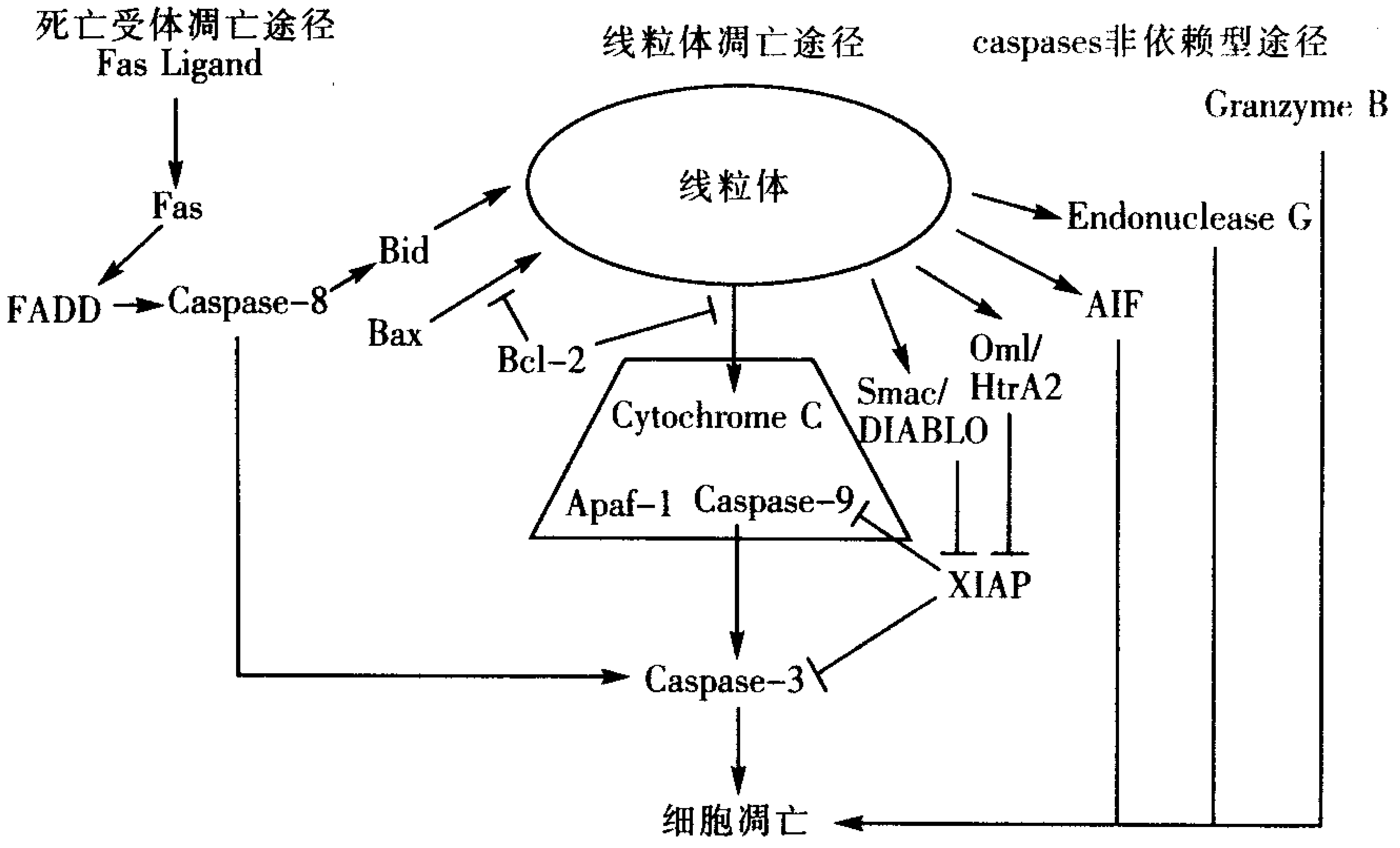


图 7-2 细胞凋亡信号转导通路

Fas 具有三个富含半胱氨酸的胞外区和一个称为死亡结构域的胞内区。Fas 的配体 FasL(fas ligand)与 Fas 结合后，Fas 三聚化使胞内的 DD 区构象改变，然后与接头蛋白 FADD(fasassociated death domain)的 DD 区结合，而后 FADD 的 N 端 DED 区(death effector domain)就能与 Caspase-8(或 Caspase-10)前体蛋白结合，形成 DISC (death-inducing signaling complex)，引起 Caspase-8、Caspase-10 通过自身剪激活，它们启动 Caspase 的级联反应，使 Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7 激活，这几种 Caspase 可降解胞内结构蛋白和功能蛋白，最终导致细胞凋亡。

Fas/FasL 系统在免疫系统中具有重要的作用，其一是参与免疫调节，活化成熟的外周 T 细胞主要通过 Fas/FasL 系统介导的细胞凋亡清除与自身抗原有交叉反应的克隆和由自身抗原激活的细胞克隆，以限制 T 细胞克隆的无限增殖，防止对自身组织的损伤，即产生外周免疫耐受。淋巴细胞凋亡异常导致的免疫耐受失控，是自身免疫性疾病的主要病因。其二是细胞毒 T 细胞(CTL)可以通过 FasL 诱导靶细胞凋亡，但遗憾的是，某些肿瘤细胞也可以通过这一途径诱导淋巴细胞凋亡，从而逃脱免疫监控。

除了死亡受体凋亡通路，细胞内还存在其他一些重要的凋亡信号传导途径。Newmeyer 等人首先报道了在无细胞(cell free)凋亡系统(如 Xenopus egg 提取物)中需要有线粒体的参与。随着细胞凋亡研究的深入，研究工作者发现许多和凋亡相关的基因表达产物(蛋白质或酶)定位于线粒体。当刺激物诱导细胞凋亡时，线粒体膜的通透性增加，线粒体内的多种促凋亡因子会被释放出来，这些蛋白包括细胞色素 C、Smac/DIABLO、Omi/HtrA2、AIF、ARTS 等，说明作为细胞能量供应站的线粒体

在细胞凋亡中发挥重要的功能，线粒体也因为与细胞凋亡之间紧密相关性成为当今生命科学领域中被广泛研究的细胞器。其中细胞色素 C 和 AIF 在细胞凋亡中发挥着尤为重要的作用。

细胞应激反应或凋亡信号能引起线粒体细胞色素 C 释放，作为凋亡诱导因子，细胞色素 C 能与 Apaf-1、Caspase-9 前体、ATP/dATP 形成凋亡体，然后召集并激活 Caspase-3，进而引发 Caspases 级联反应，导致细胞凋亡。如图 7-3 所示。

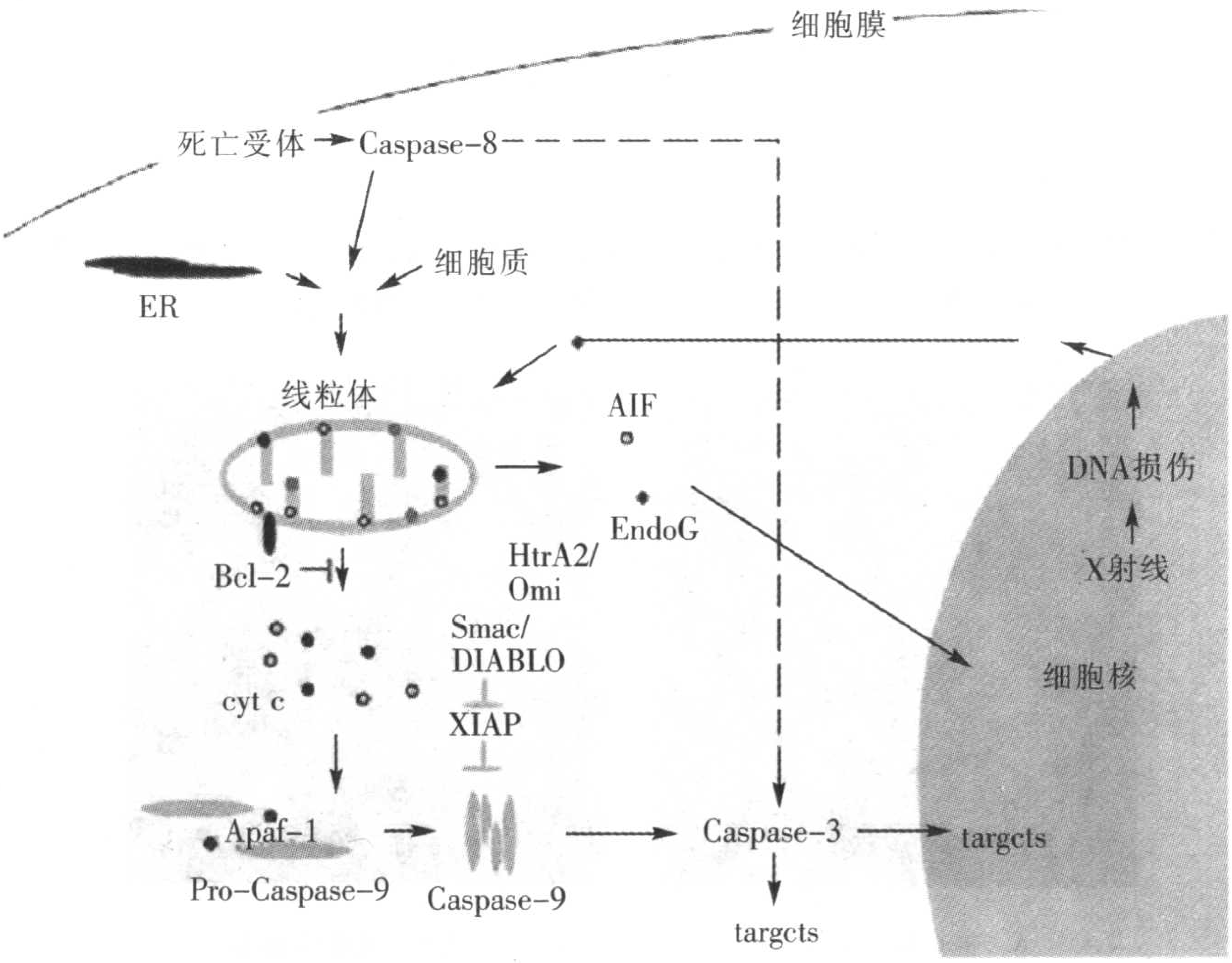


图 7-3　凋亡调控因子参与凋亡调控示意图

Bcl-2 家族蛋白的主要作用位点就在线粒体外膜上。其中 Bcl-2 和 Bcl-xL 就是通过其 BH3 结构域与 Bcl-2 家族的其他抗凋亡成员形成异二聚体，减低线粒体膜的通透性，促凋亡因子（Cytochrome C、Smac/DIABLO 和 AIF 等）被保留在线粒体膜上，细胞不能进入凋亡程序。而 Bcl-2 家族中的 Bak、Bax、Bik、Bid、Puma 等是细胞质中的促凋亡蛋白，它们可以在其他凋亡因子激活下，易位到线粒体膜上，使线粒体的结构受到损害。其中 Bid 能与 Bax 连接并别构激活 Bax（结合 Bax 并改变其构象，使 Bax 成为活性形式），而 tBid 能与 Bak 连接，并能别构激活 Bak，被激活的 Bax 或 Bak 发生同源寡聚化，易位到线粒体膜上，改变膜电位，诱发 Cytochrome C 和 Smac 等促凋亡因子从线粒体释放。

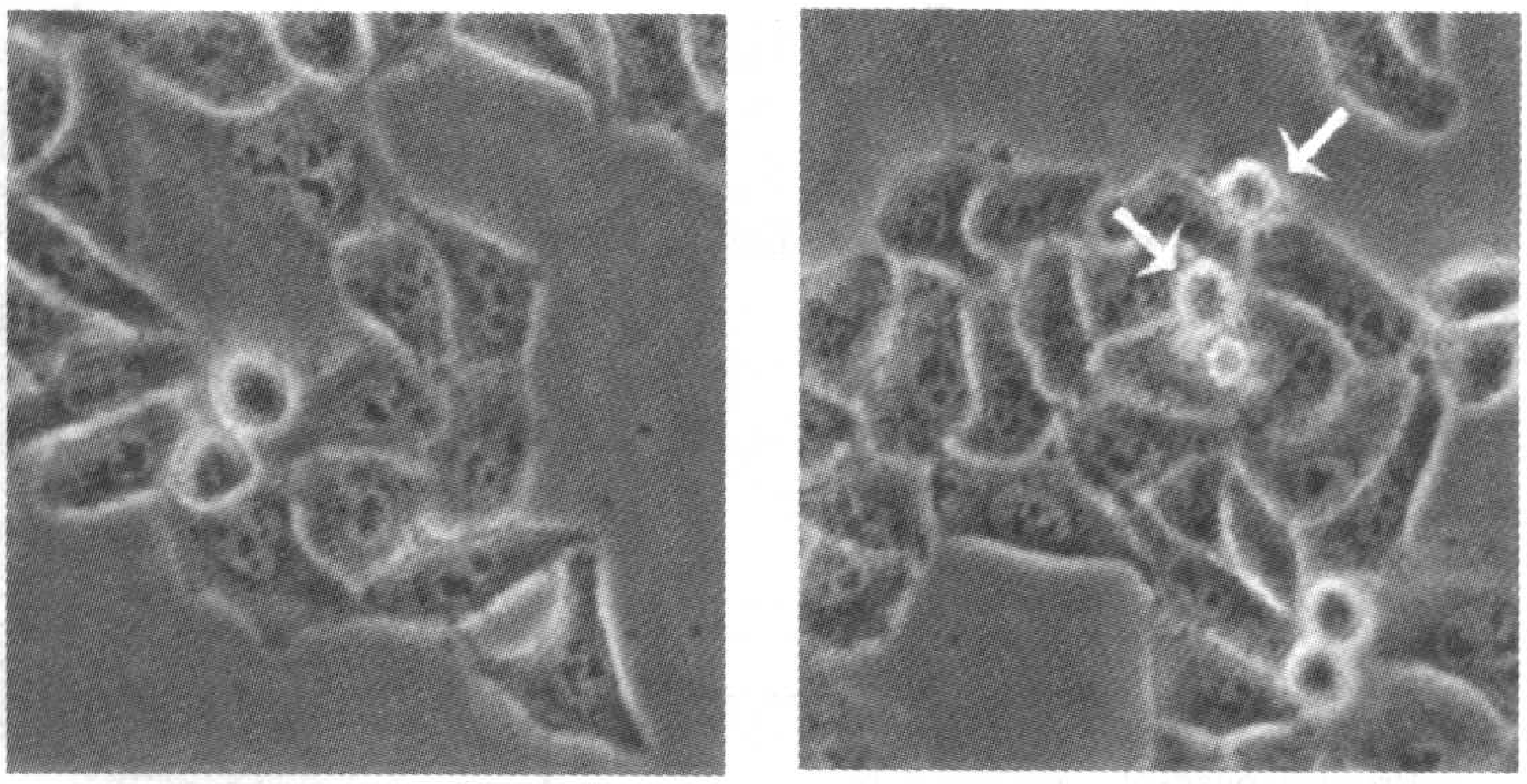
第二节　荧光显微镜对细胞凋亡的形态学观察

根据凋亡细胞固有的形态特征，人们设计了许多不同方法对其进行观察及检测。“百闻不如一见”，当然最直观的还是使用显微镜进行观察。

一、通过光学显微镜对凋亡细胞的形态学的观察

1. 未染色细胞

凋亡细胞的体积变小、变形，细胞膜完整但出现发泡现象，细胞凋亡晚期可见凋亡小体。贴壁细胞出现皱缩、变圆、脱落，如图 7-4 中 A、B 所示。



A　正常 Hela 细胞　　　　B　TRAIL 处理后 Hela

注：细胞箭头所指是处于凋亡阶段的细胞

图 7-4

2. 染色细胞

常用姬姆萨染色、瑞氏染色等。凋亡细胞的染色质浓缩、边缘化，核膜裂解、染色质分割成块状和凋亡小体等典型的凋亡形态。

二、通过电子显微镜对凋亡细胞的形态学的观察

细胞凋亡过程中细胞核染色质的形态学改变分为三期：Ⅰ期的细胞核呈波纹状(rippled)或呈折缝样(creased)，部分染色质出现浓缩状态；Ⅱ期细胞核的染色质高度凝聚、边缘化；Ⅲ 期的细胞核裂解为碎块，产生凋亡小体。如图 7-5 所示。

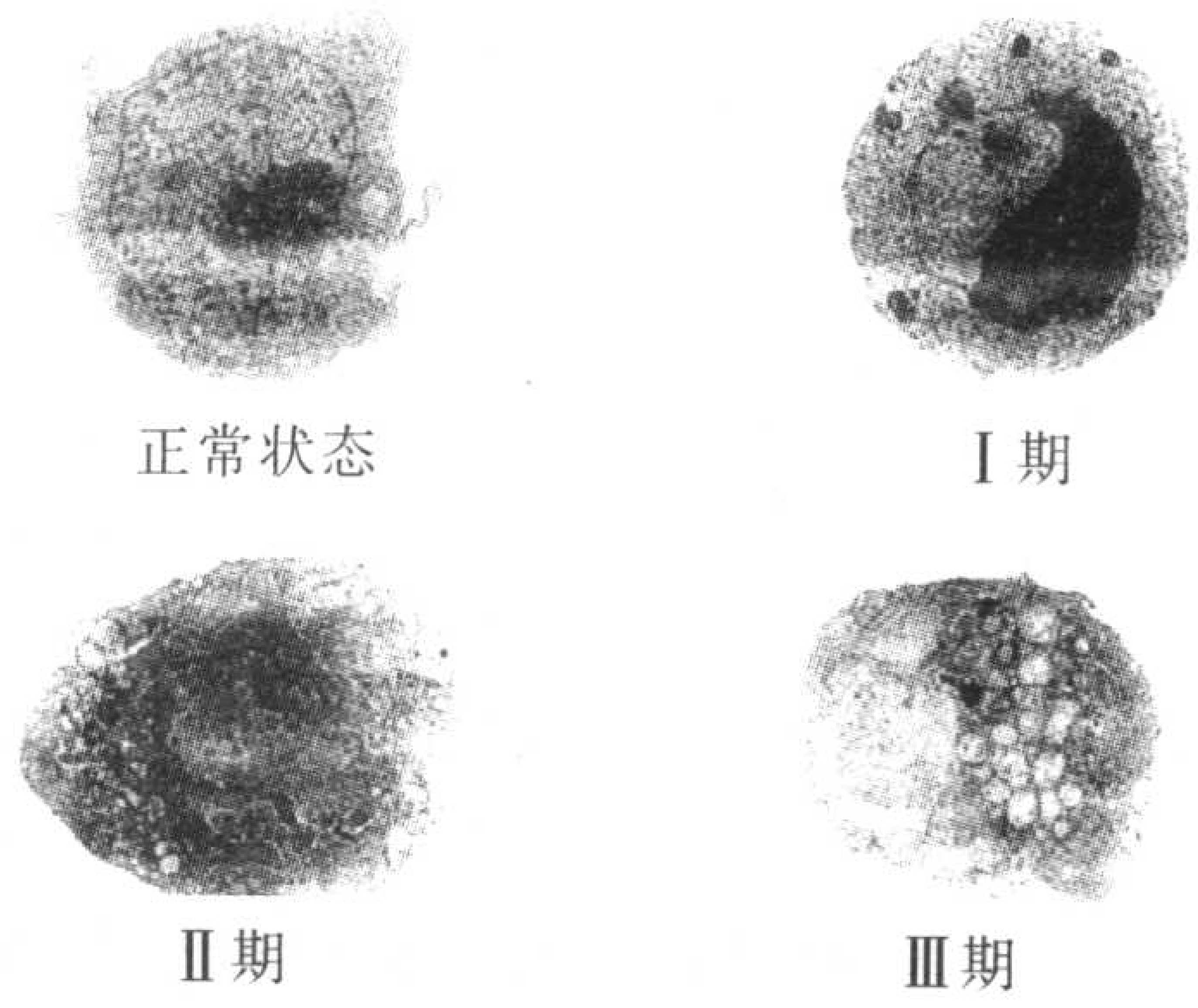


图 7-5 细胞凋亡不同阶段电镜照片

三、通过荧光显微镜对凋亡细胞的形态学的观察

通过荧光显微镜和激光共聚焦扫描显微镜对于细胞凋亡的形态学观察则更加准确;更具有针对性。一般以细胞核染色质的形态学改变为指标来评判细胞凋亡的进展情况。

1. 常用的 DNA 特异性染料

HO 33342 (Hoechst 33342)、HO 33258 (Hoechst 33258)、DAPI,这三种染料与 DNA 的结合是非嵌入式的,主要结合在 DNA 的 A-T 碱基区。紫外光激发时发射明亮的蓝色荧光。

2. 基本操作方法

(1) Hoechst 是与 DNA 特异结合的活性染料,储存液用蒸馏水配成1mg/mL的浓度,使用时用 PBS 稀释成终浓度为 2~5μg/mL。对于固定细胞和活细胞染色皆可。

取普通洁净盖玻片于 0.1M HCl 过夜后在 70%乙醇中浸泡 5min 或更长时间,无菌超净台内吹干或用细胞培养级 PBS 或 0.9% NaCl 等溶液洗涤三遍,再用细胞培养液洗涤一遍。将盖玻片置于六孔板内,在盖玻片上加滴细胞,培养过夜,得到细胞爬片,使细胞密度约为 50%~70%。

刺激细胞发生凋亡后,吸尽培养液,加入 0.5mL 固定液(4%多聚甲醛),固定 10min。

去固定液,用 PBS 或 0.9%NaCl 洗两遍,每次 3min,吸尽液体。洗涤时可用摇床,或手动晃动数次。

加入 0.5mL Hoechst 33258 染色液,染色 5min。也可用摇床,或手动晃动数次。

用 PBS 或 0.9%NaCl 洗两遍,每次 3min。滴一滴抗荧光淬灭封片液(vector公司的 vectorshield 系列)于载玻片上,盖上长有细胞的盖玻片,尽量避免气泡。使细

胞接触封片液，切勿弄反。

在荧光显微镜下可检测到呈蓝色的细胞核。激发波长在 350nm 左右，发射波长在 460nm 左右，如彩图 2 所示(见彩页 1)。

(2) DAPI 为半通透性，用于常规固定细胞的染色。储存液用蒸馏水配成 1mg/mL的浓度，使用终浓度一般为 0.5～1mg/mL，其染色方法与上类似。细胞凋亡不同阶段 DAPI 染色后的荧光图像如彩图 3 所示(见彩页 1)。

四、通过某些特定分子在细胞凋亡时定位的变化对其进行荧光标记

除了可对细胞核进行染色，观察其在细胞凋亡时的变化来了解细胞凋亡的情况，还能通过某些特定分子在凋亡时定位的变化，对其进行荧光标记后进行观察。

磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine，PS)正常位于细胞膜的内侧，但在细胞凋亡的早期，PS 可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露在细胞外环境中。Annexin-V 是一种分子量为 35k～36kDa 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，能与 PS 高亲和力特异性结合。将 Annexin-V 进行荧光素(FITC、PE)或 biotin 标记，以标记了的 Annexin-V作为荧光探针，利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生。

碘化丙啶(propidine iodide，PI)是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，但 PI 能够透过在凋亡中的晚期细胞和死细胞细胞膜而使细胞核红染。因此将 Annexin-V与 PI 匹配使用，就可以将凋亡早晚期的细胞以及死细胞区分开来。

尽管这种 Annexin-PI 双染法更多地采用流式细胞仪进行检测，但有时针对个别细胞的情况，采用荧光显微镜观察，也不失为一种直观的方法。

1. 标记方法

将正常培养和诱导凋亡的细胞爬片(如 Hela 细胞)用 70%乙醇固定后，用 PBS 洗 2 次，加入 100μL Binding Buffer 和 FITC 标记的 Annexin-V(20μg/mL) 10μL，4℃ 避光 30min，再加入 PI(50μg/mL)5μL，避光反应 5min 后，加入 400μL Binding Buffer，10min 后用 PBS 洗 2 次，立即用荧光显微镜进行观察。如彩图 4 所示(见彩页 1)。

2. 注意事项

(1) 整个操作动作要尽量轻柔，勿用力吹打细胞。

(2) 操作时注意避光，反应完毕后，尽快在一小时内检测。

细胞凋亡同细胞所经历的其他生理过程一样，由一个复杂的蛋白作用网络调控，因此对这些蛋白的标记和荧光观察就可以直观地了解细胞凋亡的发生和发展过程中的细节，以上两种荧光观察的方法更多地应用于细胞凋亡的研究之中。

第三节　凋亡调控分子的荧光标记在细胞凋亡研究中的应用

细胞凋亡调控分子的荧光标记主要分为两种：荧光分子的融合表达标记；荧光分

子的亲和标记。

一、荧光显微镜在对 Survivin 及其剪接体参与的细胞凋亡研究中的应用

Survivin 是 IAP 家族中的一个特定成员，它特异性地在肿瘤细胞中高度表达，具有阻止细胞凋亡和调控细胞周期的双重功能，但到目前为止，关于 Survivin 的细胞定位以及其抗凋亡机理还处在争论之中。

研究人员发现，Survivin 能与重要促凋亡蛋白 Smac 直接结合。通过免疫荧光分析以及激光共聚焦技术显示 Survivin 与 Smac 在细胞间期共定位于细胞质中。Survivin 抑制 TAXOL 诱导的细胞凋亡很可能是通过拮抗 Smac 的促凋亡作用来完成的。

首先用免疫荧光染色的方法，通过直接观察 Cytochrome C 和 Smac 在 Hela 细胞中的定位情况及其变化过程来进一步验证 Cytochrome C 和 Smac 的释放情况。Hela 细胞在未用 Taxol 处理时，Cytochrome C 和 Smac 的定位与线粒体特异荧光染料 MitoTracker Red 完全重合，说明它们都定位在线粒体中；而在 Hela 细胞受到 Taxol 24h 的处理后，发现 Cytochrome C 和 Smac 与 MitoTracker Red 只有部分重合，其他部分却定位在细胞质，证明 Cytochrome C 和 Smac 可被 Taxol 诱导从线粒体中释放出来。这些结果充分说明了在 Taxol 诱导的 Hela 细胞凋亡过程中，线粒体凋亡途径也参与其中，如彩图 5 所示(见彩页 2)。

1. *方法(间接免疫荧光法)*

(1) 取出长有细胞的盖玻片，吸干上面残留的培养基后，用适量预热的 PBS 润洗细胞爬片 1～2 次；

(2) 吸去残留液体，用 4%的多聚甲醛/PBS 室温固定细胞约 15～20min；

(3) 吸去残留液体，用适量的 PBS 清洗细胞 3 次，每次 5～10min；

(4) 0.05%的 Triton X-100/PBS 室温下处理 5～10min；

(5) 用 0.1% Tween/PBS 清洗细胞 2 次，每次 5～10min；

(6) 用 3% BSA/PBS 封闭细胞 30min；

(7) 将适量的含有一抗的 3% BSA/PBS 加到含有细胞的盖玻片上，室温下孵育 1h；

(8) 吸去液体，用 0.1% Tween/PBS 清洗细胞 3 次，每次 5～10min；

(9) 将适量的含有二抗的 3% BSA/PBS 加到含有细胞的盖玻片上，室温下孵育 1h；

(10) 吸去液体，用 0.1% Tween/PBS 清洗细胞 3 次，每次 5～10min；

(11) PBS 清洗细胞 3 次，每次 5～10min；

(12) 加适量的 MitoTracker Red CMXRos 染细胞 5～10min；

(13) PBS清洗细胞3次,每次5～10min;

(14) 最后吸去残留的液体后,在载玻片中央滴一滴抗淬灭剂,然后小心地盖上长有细胞的细胞爬片,吸去周围多余的液体,用指甲油将盖玻片四周封固;

(15) 在荧光显微镜下观察蛋白定位情况。

2. MitoTracker Red CMXRos的使用

通常使用的线粒体标记物主要有两种:一种是直接标记的荧光分子;一种是耦联荧光分子的抗体。前者使用较多,主要是因为定位于线粒体的蛋白是我们感兴趣的研究对象。

表7-2是invitrogen公司的一些广泛使用的产品(http://probes.invitrogen.com/handbook/table/0341.html)。

表7-2 线粒体荧光探针的光谱特性

货号	线粒体标记探针	最大激发波长(nm)	最大发射波长(nm)	氧化状态
M7514	MitoTracker Green FM * (在正常情况下不产生荧光)	490	516	未检测
M7510	MitoTracker Orange CMTMRos	551	576	氧化态
M7511	MitoTracker Orange CM-H_2TMRos	551 ** (非氧化态不发荧光)	576 ** (非氧化态不发荧光)	还原态
M7512	MitoTracker Red CMXRos	578	599	氧化态
M7513	MitoTracker Red CM-H_2XRos	578 ** (非氧化态不发荧光)	599 ** (非氧化态不发荧光)	还原态
M22425	MitoTracker Red 580	581	644	未检测
M22426	MitoTracker Deep Red 633	644	665	未检测

注: * 表示MitoTracker Green FM在正常情况下不产生荧光; ** 表示非氧化态不发荧光

若显微镜的滤色片是MitoTracker Red CMXRos,对于活细胞染色一般使用20nM,对于固定细胞则使用40nM,当然较低浓度的使用是为了避免非特异性的标记(具体使用方法可参考:http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07510.pdf)。

Survivin除了可阻止细胞凋亡外,它的另一重要功能是参与细胞有丝分裂的调控。Skoufias等人报道,Survivin是一个与着丝粒相关的细胞动点蛋白。为了进一步验证这个结果并探索Survivin与Smac在细胞内的分布关系,用GFP融合蛋白的方法在活细胞内观察Smac、Survivin及其突变体的定位情况。首先在Hela细胞内

成功表达了一系列相关蛋白，它们是 GFP，GFP/Survivin，GFP/Surv-BIR，GFP/Surv-D71R 和 GFP/Smac。在质粒转染 48h 后，用 2μM Hoechst 33342 染色 30min 后，在荧光显微镜观察它们在活细胞内的定位，如彩图 6 所示(见彩页 2)。在不同细胞周期，GFP 本身在细胞内都有广泛分布，说明它不会影响其融合蛋白在细胞内的定位；而 GFP/Survivin 在细胞间期定位于细胞质，当细胞进入 Metaphase 时，它移位到 central spindle midzone，并在 Telophase 定位在 midbody 中，这进一步证明了 Survivin 在有丝分裂中重要调控作用。此外，对 Survivin 的突变体的定位进行了观察分析，发现 Surv-D71R 在细胞间期及 Telophase 中和野生型 Survivin 的定位情况相同，但在 Metaphase 中 Surv-D71R 却没有 central spindle midzone 的定位；Survivin 的另一突变体 Surv-BIR 在细胞内的分布与 GFP 完全相同，说明它丧失了其野生型 Survivin 在细胞质、central spindle midzone 或 midbody 的定位，从而也间接证明了 Survivin C 端的 Coiled-coil 结构域对于 Survivin 的细胞周期调控功能是必要的。至于 GFP/Smac，我们发现它在细胞间期(Interphase)和 Survivin 的细胞分布一样，也定位于细胞质，但在 Metaphase 和 Telophase 中，其定位明显区别于 Survivin，这在一定程度上也说明 Smac 不直接参与细胞有丝分裂的调控，但它在细胞间期可与 Survivin 在细胞内有共同的定位空间——细胞质，表明 Survivin 和 Smac 的结合在细胞内的一定时期是有空间可能性的。

其样本制备较间接免疫荧光更加简单，由于细胞中 GFP 耦联蛋白可发荧光，故只需在活细胞中转染质粒后，过夜，去培养液，加入 Hoechst 染色即可。

3. 细胞转染方法

(1) 按约(1×10^5)～(3×10^5) 细胞/孔的量在六孔板中接种指数期生长的细胞，在 37℃、5%CO_2 孵箱中培养过夜，直至细胞密度达 50%～80%。

(2) 制备下列溶液：

方法 A：在 100μL 不含血清的培养液中加入 1～2μg DNA。

方法 B：在 100μL 不含血清的培养液中加入 2～25μL LIPOFECTAMINE 试剂。

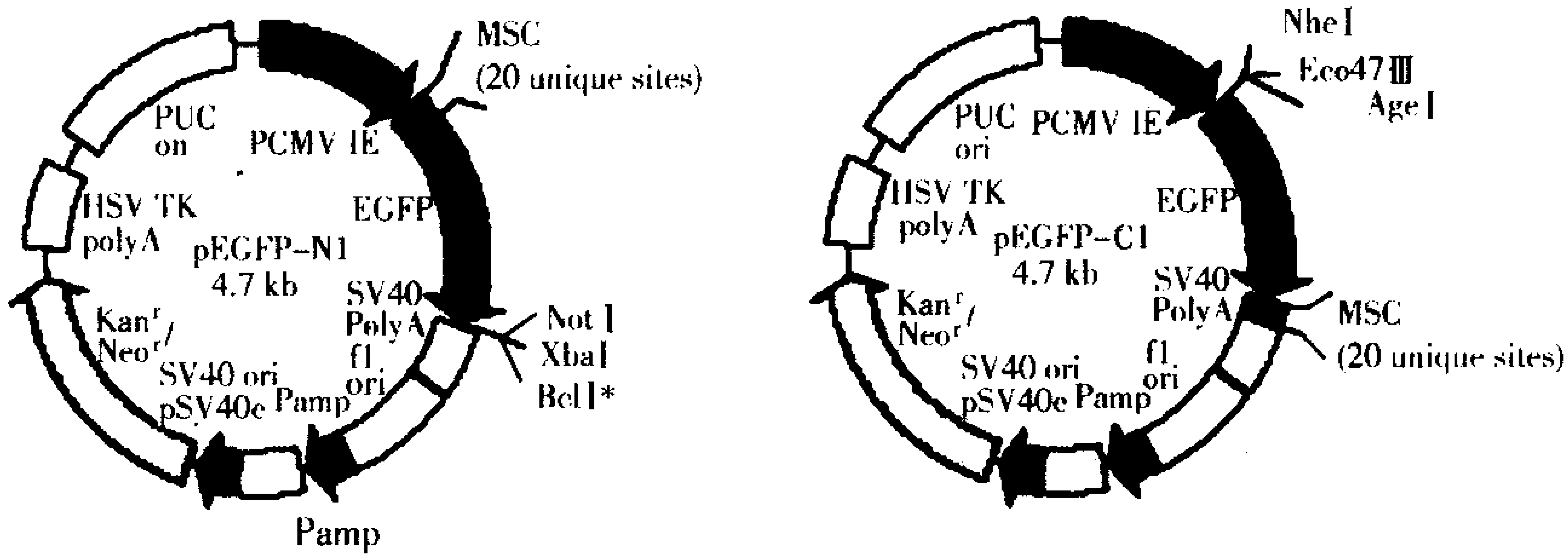
(3) 混合上述两溶液，混匀，室温放置 15～45min，使之形成 DNA—脂质体复合物。

(4) 用 2mL 不含血清的培养液润洗细胞。

在上述混合液中加入 0.8mL 不含血清的培养液，混匀，加到细胞中。在 37℃、5%CO_2 孵箱中培养 2～24h。

这里所使用的 GFP 融合表达载体来自 CLONTECH 公司(http://orders.clontech.com/clontech/techinfo/vectors/catle.html)。下面作简单介绍，如图 7-6 所示。

其 GFP 表达蛋白的最大激发波长为 479nm，最大发射波长为 509nm。除此之外该公司的其他载体也被广泛应用，如应用于在 Survivin 剪切体 Survivin-deltaEx3 蛋白序列中核仁定位序列(NoLS)和降解信号序列(degradation signal)的鉴定。



pEGFP-N1

G CTA GCG CTA CCG GAC TCA GAT CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG CAG TCG ACG

Not I　Eco47 Ⅲ　　Bgl Ⅱ　Xho I　Sac I　Hind Ⅲ　EcoR I　Pst I　Sal I

EGFP →

GTA CCG CGG GCC CGG GAT CC A CCG GTC GCC ACC ATG GTG

Kpn I　Sac Ⅱ　Apl I　Xma I　BamH I　Apa I

pEGFP-N1

EGFP →

TAC AAG TCC GGA CTC AGA TCT CGA GCT C AA GCT TCG AAT TCT GCA GTC GAC

Bsp Ⅱ　Bgl Ⅱ　Xho I　Sac I　Hind Ⅲ　EcoR I　Pst I　Sal I

STOPs

GGT ACC GCG GGC CCG GGA TCC ACC GGA TCT AGA TAA CTG ATC A

Kpn I　Sac Ⅱ　Apl I　Xma I　BamH I　Xbal*　Bcl I*

图 7-6　GFP 表达载体及其多克隆位点图谱

通过构建了一系列质粒，其中包括 pEGFP-C1/Survivin 及 pEGFP-C1/SVV-deltaEx3，并在 Hela 细胞中表达其相应的 GFP 融合蛋白，再用 Hoechst 33342（2μg/mL，细胞核特异染色剂）处理后通过荧光显微镜在活细胞状态下观察蛋白的定位情况。在细胞间期（interphase），GFP/Survivin 定位于细胞质并排斥即不定位于细胞核，而它的剪切体 GFP/SVV-deltaEx3 则主要定位于细胞核质部分（nucleoplasm）并排斥核仁（nucleoli），如彩图 7 所示（见彩页 2）。

当用蛋白酶抑制剂 MG132（10μM）或 ALLN（100μM）处理转染后的 Hela 细胞 12h 后，GFP/SVV-deltaEx3 定位发生了变化，它不仅定位于细胞核质部分而且可聚集在核仁，而 GFP 和 GFP/Survivin 在蛋白酶抑制剂 MG132 处理后，细胞定位并没有发生变化，即没有核仁的聚集，说明 SVV-deltaEx3 在蛋白酶抑制剂处理下可定位于核仁，如彩图 8 所示（见彩页 3）。

为了进一步验证 SVV-deltaEx3 的核仁定位，在 Hela 细胞中共表达 GFP/SVV-deltaEx3 和 DsRed/nucleolin（nucleolin 是一个核仁蛋白，特异性定位于核仁），发现

在 MG132 处理后可于 DsRed/nucleolin 共定位，说明 SVV-deltaEx3 确实可聚集定位于核仁部分，如彩图 9 所示（见彩页 3）。

SVV-deltaEx3 蛋白在高表达时可定位于核仁部位，说明此蛋白很可能含有核仁定位序列。为了鉴定这个序列，Song 等构建表达了一系列 SVV-deltaEx3 的蛋白片段，并且研究了它们在 Hela 细胞中的定位。我们的研究发现 GFP/SVV-deltaEx3 (74-91)是具有核仁定位的最小片段，且它可与 DsRed/nucleolin 共定位说明它（即 MQRKPTIRRKNLRKLRRK）就是核仁定位序列（NoLS），序列比较发现它与其他 NoLS 没有相同性，但它们都富有 R 和 K 氨基酸。

二、荧光显微镜在促凋亡蛋白 RIP3 核质穿梭特性鉴定中的应用

据文献报道，RIP3 的过量表达可明显诱导肿瘤细胞的凋亡，并初步确定 RIP3 具有诱导细胞凋亡活性的功能区域位于其独特的 C 端序列，其中 RIP3ΔN223 是已报道的具有诱导细胞凋亡活性的最小功能区域。但是，该区域是一个长为 295 个氨基酸的序列，它包括 RIP3 蛋白整个 C 端区域以及 kinase domain 部分 C 端区域，因此，RIP3 具有诱导细胞凋亡活性的最小功能区域并不清楚。此外，关于 RIP3 诱导细胞凋亡的途径及分子机制等研究也显得苍白无力，许多细节则更是一无所知。我们关于 RIP3 的研究也表明，在没有任何外界凋亡刺激因子存在的情况下，RIP3 本身就是一个能迅速并强烈诱导肿瘤细胞凋亡的蛋白分子。因此，尽快确定 RIP3 具有诱导细胞凋亡活性的最小功能区域对于进一步了解和阐明 RIP3 诱导细胞凋亡的途径与分子机制等具有十分重要的意义。

对于某个特定的蛋白质来说，它在细胞组分中的定位对于该蛋白发挥其正常的生物学功能极其重要。RIP3 作为 TNF-α 信号转导通路中的一个中介蛋白分子，通过与 RIP 的相互作用而募集到 TNFR1 复合物中，因此，RIP3 一般被认为主要定位于细胞质中。然而，从现有的文献报道来看，关于 RIP3 精确定位的研究结果是不一致的。

最近的研究表明，TRADD 能从细胞质转运到细胞核中，并且这种转运是通过利用 leptomycin B(LMB)抑制 CRM1 介导的细胞核输出来调控的。与 TRADD 类似，RIP3 同样也是 TNF-α 下游的一个接头蛋白并可募集到 TNFR1 信号转导复合物中，并且被认为主要定位于细胞质中，因此，我们预测 RIP3 可能也存在着与 TRADD 类似的核质穿梭。

通过将 GFP-RIP3 瞬时转染 Hela 细胞，表达 GFP-RIP3 的 Hela 细胞未经 LMB 处理（即仅用等体积的乙醇处理）主要定位于细胞质中。但是，当表达 GFP-RIP3 的 Hela 细胞与 LMB 于 37℃孵育 1h 后，发现 GFP-RIP3 的定位发生了剧烈改变，GFP-RIP3 从细胞质中迁移到细胞核中并分布在包括细胞核和细胞质在内的整个细胞中，并且在细胞核中有轻微的蓄积，提示 RIP3 可从细胞质迁移到细胞核中，并且 RIP3 从细胞核到细胞质的有效输出是依赖于 CRM1 的。当用 LMB 处理细胞时，RIP3 从

细胞核的输出被阻断，因此，那些在细胞质中合成的 RIP3 蛋白就开始不断地进入细胞核并在细胞核中蓄积。作为阴性对照，我们在同样条件下检测了 YFP_3（一种黄色荧光蛋白串联的三聚体）在细胞中的定位。在没有 LMB 的情况下，YFP_3 主要定位于细胞质中。但是，当表达 YFP_3 的细胞和 LMB 于 37℃ 孵育 1h 后，与 GFP-RIP3 明显不同，YFP_3 的定位未发生明显改变，仍定位于细质中(right panel)。此外，也检测了 RIP3 对 LMB 在 4℃条件下处理的效应。在这种条件下，不仅 CRM1 介导的 RIP3 从细胞核的输出 LMB 的存在而被阻断，而且 RIP3 蛋白主动的细胞核输入也因低温而停滞。正如我们所预料的，GFP-RIP3 在 4℃条件下经 LMB 处理后仍是细胞质定位(middle panel)，如彩图 10 所示(见彩页 3)。

因此，综上所述，研究的结果表明，一方面 RIP3 从细胞核到细胞质的输出是 CRM1 依赖的，另一方面 RIP3 蛋白的细胞核输入是一个温度敏感的过程。

我们在研究中还构建了一系列突变体，如图 7-7 所示。鉴定了 RIP3 的核输出及核定位序列，蛋白质从细胞核中的输出通常是由富含亮氨酸的细胞核输出信号所介导的，并且除此之外，我们还检测了 NES-2 的细胞核输出活性对于 LMB 处理随时间变化的情况富含亮氨酸的细胞核输出信号可与其输出受体 CRM1 相互作用，这种相互作用可被 LMB 特异性地抑制。为了测试这两个 NES 对于 LMB 是否敏感，我们检测了 LMB 处理对于 NES-1 和 NES-2 输出活性的影响效应，如彩图 11 所示(见彩页 4)。

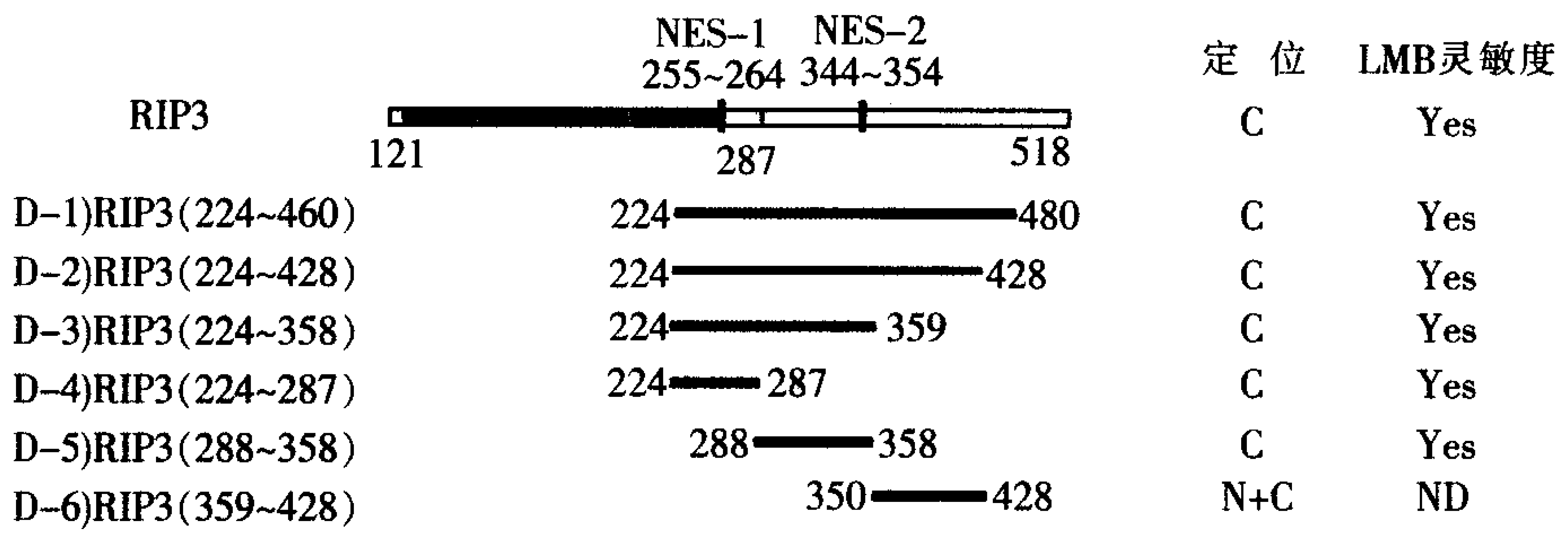


图 7-7 RIP3 的各种剪接突变体示意图及其细胞内分布

经过仔细检查，在 aa 224-518 区域中初步拟定 3 个不同的 NLS 样序列。如图 7-8所示，氨基酸序列^{313}RRFSIPESGQGGTEMDGFRR^{332}(NLS-1)与经典的bipartitle NLS 类似，其两端各有两个连续的碱性氨基酸(精氨酸)，中间间隔 16 个氨基酸。但含有 NLS-1 的 RIP3(288-358)-NES-2m 不足以将 GFP 定位到细胞核中，故 NLS-1 不是功能性的 NLS。^{363}KKCPSLTKRSR^{373}(NLS-2)也与 bipartitle NLS 类似，其左端含有两个连续的碱性氨基酸(赖氨酸)，右端含有 3 个碱性氨基酸(精氨酸和赖氨酸)，中间间隔 5 个氨基酸。然而，含有 NLS-2 的 GFP-RIP3(359-428) 并不定位于细胞核中，表明 NLS-2 也不是功能性的 NLS。^{481}PSGKGRGL^{488}(NLS-3)在序列上非常类似人 c-Myc 蛋白的细胞核定位信号^{320}PAAKRVKL^{327}，但是含有 NLS-3 的

GFP-RIP3ΔN460 并不定位于细胞核中，提示 NLS-3 也不是一个功能性的 NLS，如图 7-8 所示。

TEPSLVYEAVCNRQNRPSLAELPQAGPETPGLEGLKELMQLCWSSEPKDR 273
NES-1

PSFQECLPKTDEVFQMVENNMNAAVSTVKDFLSQLKSSNRRFSIPESGQG 323
NLS-1

GTEMDGFRRTIENQHSRNDVMVSEWLNKLNLEEPPSSVPKKCPSLTKRSR 373
NES-2 NLS-2

AQEEQVPQAWTAGTSSDSMAQPPQTPETSTFRNQMPSPTSTGTPSPGPRG 423

NQGAERQGMNWSCRTPEFNPVTGRPLVNIYNCSGVQVGDNNYLTMQQTTA 473
NLS

LPTWGLAPSGKGRGLQHPPPVGSQEGPKDPEAWSRPQGWYNHSGK 518
NLS-3

图 7-8 RIP3 的核定位序列预测与鉴定示意图

如果仅仅从经典 NLS 的共有序列上判断，在该区域中似乎并不存在着具有功能的 NLS，因此，我们认为在该区域中可能还存在着一个“非常规”的 NLS，从而具有将 RIP3ΔN350 定位到细胞核中的能力。基于研究结果，缺失突变体 RIP3ΔN350、RIP3ΔN428、RIP3(429～483)、RIP3(429～472)、RIP3(442～483) 和 RIP3(442～472) 均显示相似的细胞核定位。在这 6 个片段中，aa 442～472 似乎是具有将 GFP 靶向细胞核功能的最小片段，如彩图 12 所示(见彩页 4)。

因为比 aa 442～472 更小的一段序列 aa 451～472 已丧失了细胞核定位的功能。因此，我们将 aa 442～472 定义为一个“非常规”的 NLS，尽管该序列不具有经典 NLS 的任何特征。

利用荧光显微镜技术便于研究荧光蛋白的融合表达，在研究凋亡调控蛋白的定位及其凋亡特性中起到了重要作用。

第四节 其他荧光技术在细胞凋亡研究中的应用

一、Caspase 活性的荧光检测

Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用，其中 Caspase-3 为关键的执行分子，它在凋亡信号传导的许多途径中发挥功能。Caspase-3 正常以酶原(32kDa)的形式存在于胞浆中，在凋亡的早期阶段，它被激活，活化的 Caspase-3 由两个大亚基(17kDa)和两个小亚基(12kDa)组成，裂解相应的胞浆胞核底物，最终导

致细胞凋亡。但在细胞凋亡的晚期和死亡细胞，Caspase-3 的活性明显下降。

因此，定量地测定 Caspase-3 的活性，就成为判定及衡量细胞凋亡水平的重要尺度。荧光底物和荧光分光光度计的广泛应用使 Caspase-3 活性的测定变得简单直观。

1. *原理*

这里以 invitrogen 的 Caspase-3 assaykit 为例，活化的 Caspase-3 能够特异切割底物，水解肽键。根据这一特点，设计出荧光物质耦联的短肽 Ac-DEVD-R110。在共价耦联时，R110 不能被激发荧光，短肽被水解后释放出 R110，自由的 R110 才能被激发发射荧光。根据释放的 R110 荧光强度的大小，可以测定 Caspase-3 的活性，从而反映 Caspase-3 被活化的程度，如图 7-9 所示。

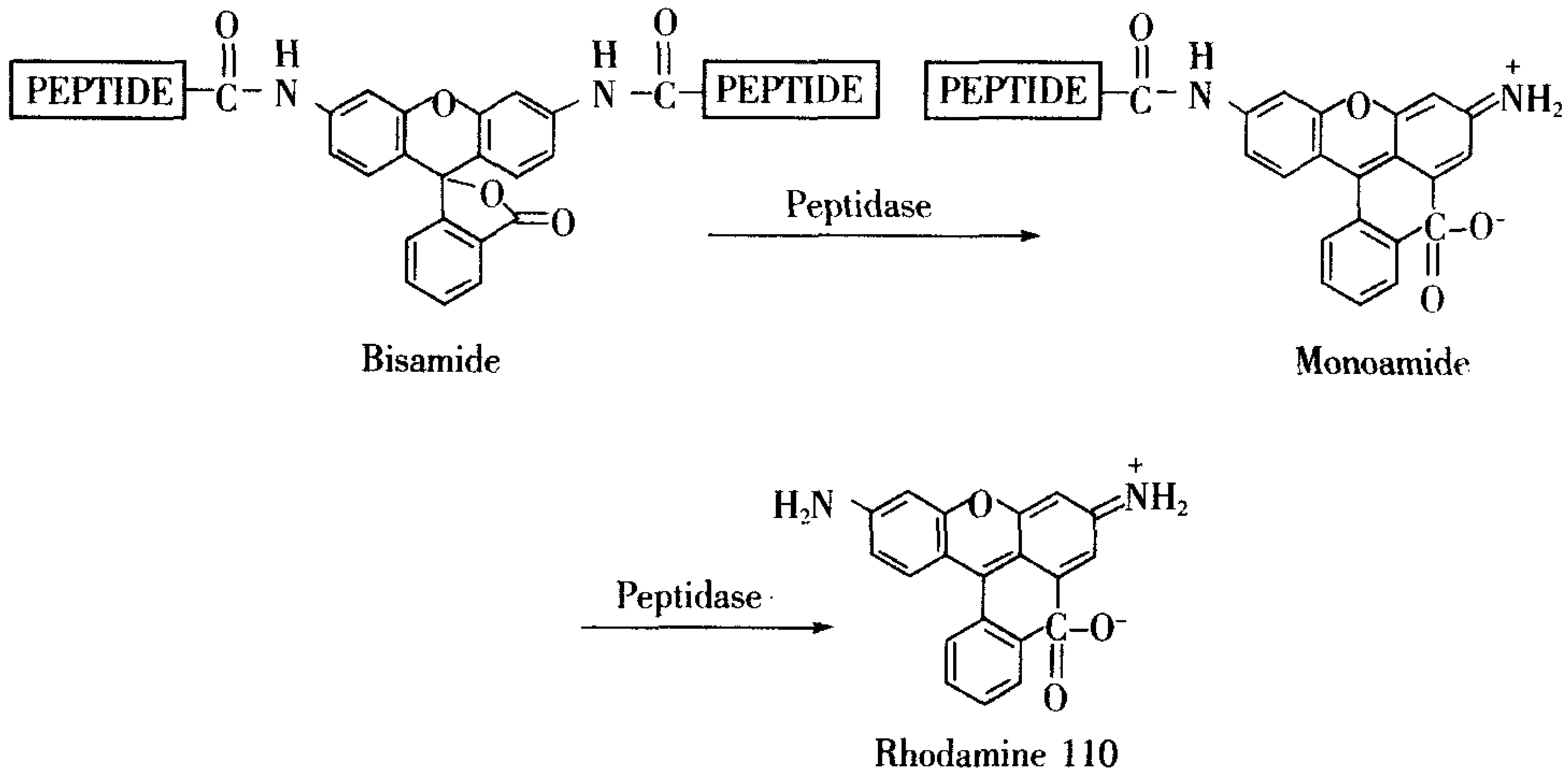


图 7-9 Caspase assay kit 原理图

2. *方法*

收获正常细胞或凋亡细胞 → PBS 洗涤 → 制备细胞裂解物 → 加 Z-DEVD-R110(Caspase-3 四肽荧光底物)→ 37℃反应 1h → 荧光分光光度计(Polarstar)分析荧光强度(Ex＝496nm，Em＝520nm)。

同类产品在 invitrogen 公司可以购得(http://probes.invitrogen.con/servlets/datatable?item＝13184&id＝32102)。

Caspase inhibitor Z-VAD-FMK 是被用来抑制 Caspase 活性的抗凋亡药物。由于其与 Caspase 的较高的亲和力，将其与 FITC 耦联后变成为 Caspase 的良好标记物。而这一试剂最大的特点是可以透过细胞膜，用于对活细胞的标记。其储液浓度为 5mM(DMSO)，使用浓度为 10μM。

3. *操作步骤*

(1) 将 1×10^5 个细胞/mL Jurkat cells 在 RPMI-1640＋10%FBS 37℃、5%CO_2 培养 2 天至 5×10^5 个细胞/mL；

(2) 用 0.01% poly-L-lysine solution 处理玻片备用；

(3) 在待检细胞中加入 anti-Fas mAb(Clone CH-11, MBL International)至 0.1μg/mL,37℃孵育 3～4h;

(4) 加入 CaspACE™ FITC-VAD-FMK 至 10μM,避光反应 20min;

(5) 300×g 离心 5min,用 PBS 洗涤后相同条件离心一次后,在 PBS 中重悬细胞至 1.5×10^6 个细胞/mL;

(6) 将细胞悬液加在预先处理的玻片上室温孵育并吸附 5min;

(7) 避光,并用 10%福尔马林室温固定 30min;

(8) PBS 洗涤 5min,重复 3 次;

(9) 封片后用荧光显微镜进行观察。

二、蛋白表达调控元件活性的萤光检测

在细胞生理学研究中,报告基因成为广泛应用于测量实验条件影响效果的方便工具,应用范围很广,包括分析基因转录和调控、受体功能和细胞内信号转导途径、蛋白质折叠和代谢、病原体与宿主细胞的相互作用、基因功能的 RNAi 抑制等。报告基因的原理很简单:将易于观察的参数与基因表达联系起来。然而,由于技术不断发展,在特定情况下如何选择最合适的报告基因和最合适的检测方法需要摸索。一般来说,当实验需要高度灵敏、准确定量,或进行多个样品快速分析时,优先考虑萤光报告基因。

由于细胞本身的复杂性,从一个报告基因得到的数据的量可能不足以获得可靠的结果。因此,选择报告基因的首要考虑因素是确定单个报告基因是否足够完成任务,如果需要更多的信息量,建议用双报告基因。

由双报告基因提供的更多的信息能通过两个途径改善实验结果:

(1) 减小随机变化,这些随机变化可能掩盖有意义的关联。

(2) 使干扰现象正态化,这些干扰现象可能存在于生物系统的内部。双萤光检测允许使用者测量两个报告基因的表达,或者既测量一个报告基因,又测量细胞活性。在所有情况下,从一个样品可以顺序测量两个检测。大多数检测试剂都为多孔板而优化。

最常用的双检测的基础是将萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶的化学相结合。原理是这些萤光素酶使用不同的底物,于是可以由酶特异性来区分。这个方法由向每一样品中加入两种试剂,每个试剂加入后测一次萤光组成。第一个试剂激活萤火虫萤光反应;第二个淬灭萤火虫萤光素酶同时启动海肾萤光素酶反应。

对于检测方法,最常见的情况是用终点检测法测量遗传报告基因。在这些检测中,细胞在各种培养条件下先培养一段时间,然后被裂解,测量积累在这些细胞中的新合成的报告基因。当然,在有条件时,也可以对活细胞进行非裂解性的报告基因检测。这些检测允许持续地监测活细胞中的报告基因表达。

细胞凋亡也是一个程序化的过程，其中一系列蛋白在转录水平上的调控对于这一进程起关键作用。而蛋白的转录主要和转录因子给其靶 DNA 序列即 promoter 的活性有关。而对于转录因子的鉴定及 promoter 区活性的测定，都离不开萤光素酶报告基因检测体系的使用。

下面对 promega 公司的 Dual-Luciferase® Reporter Assay System 作简单介绍。

此处使用的萤光素酶报告基因载体是 pGL3 系列，如图 7-10A、7-10B 所示。包括：

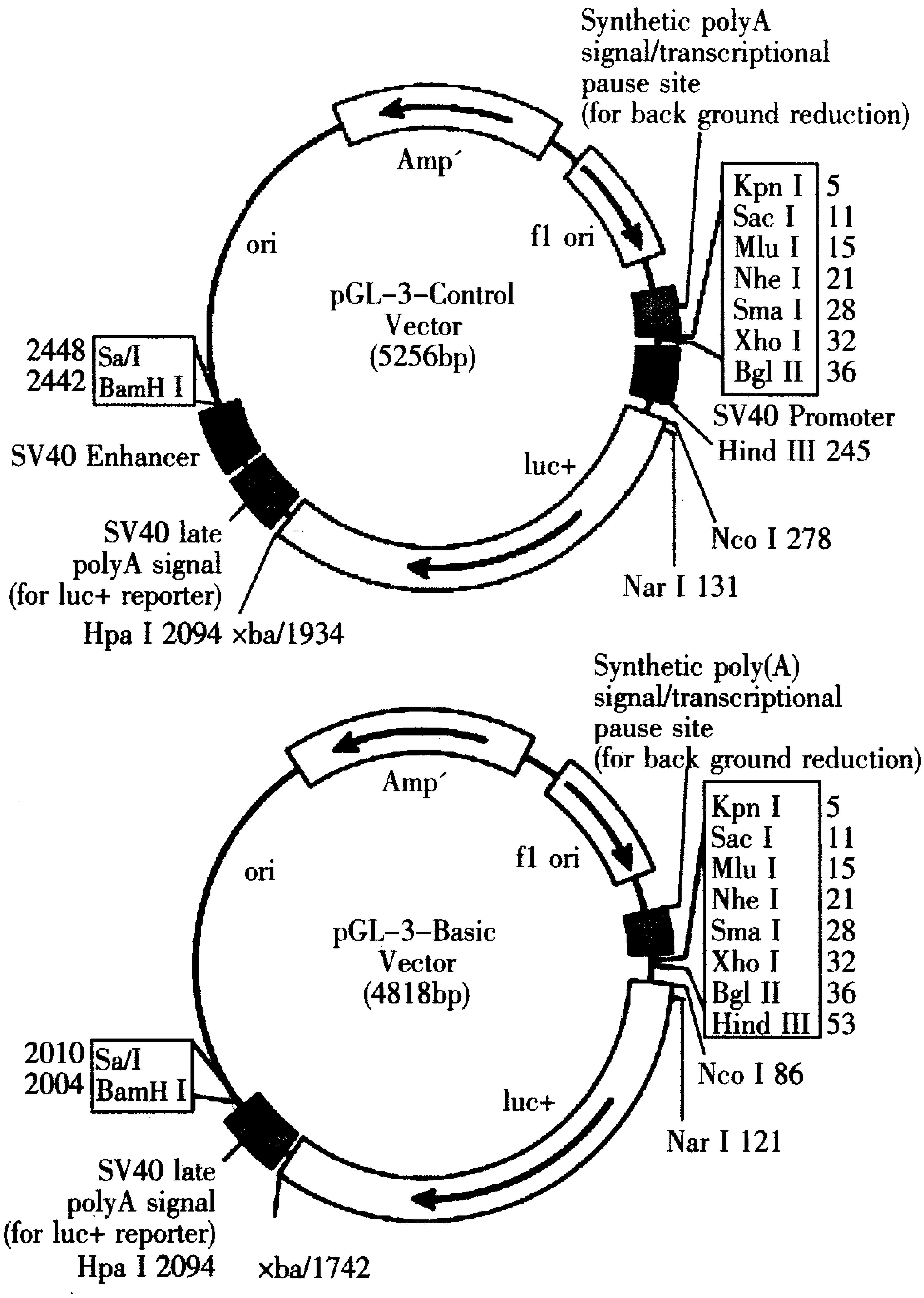


图 7-10A PGL3 报告基因系统表达载体图谱示意图

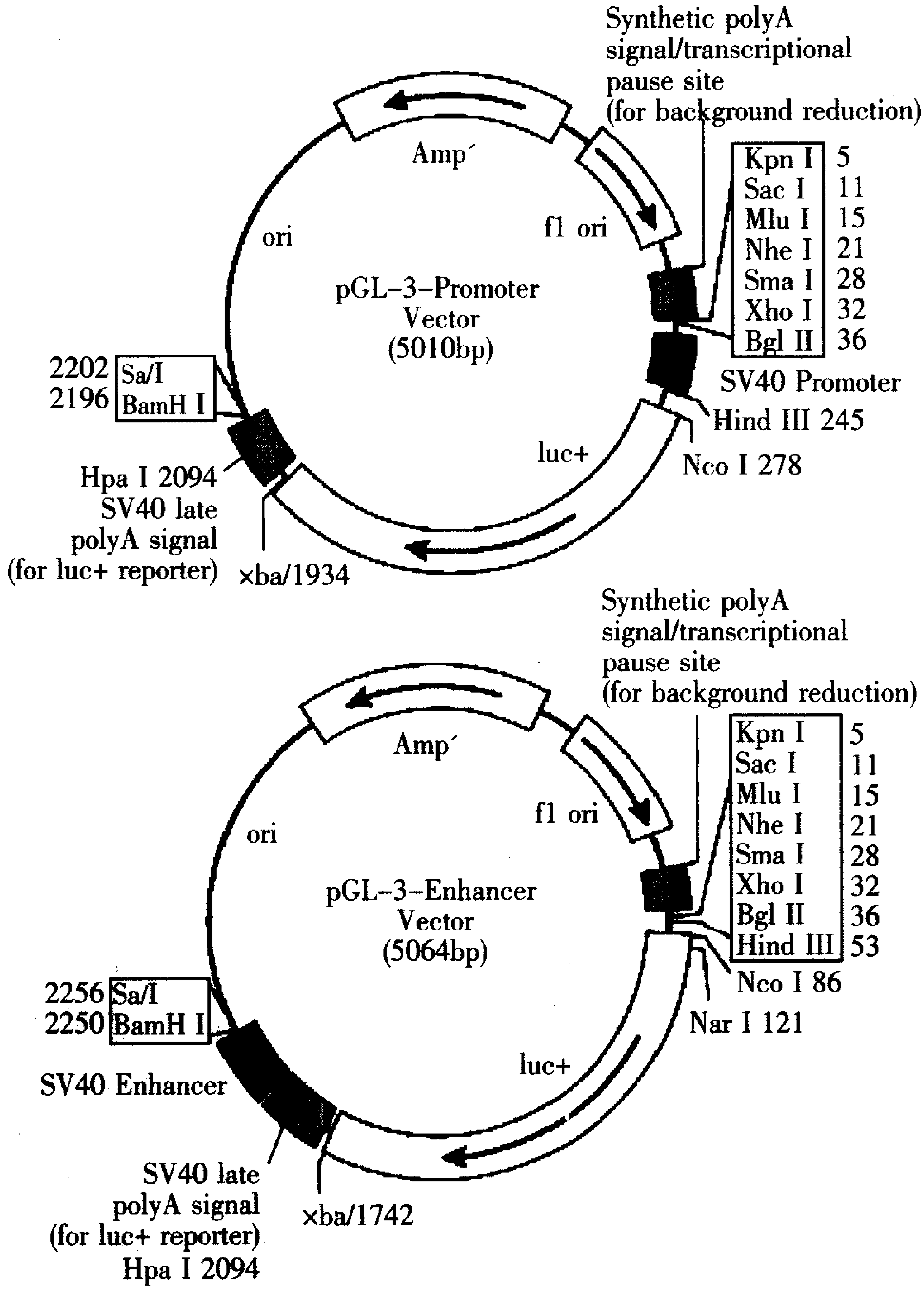


图 7-10B PGL3 报告基因系统表达载体图谱示意图

pGL3-Control Vector、pGL3-Basic Vector、pGL3-Promoter Vector 和 pGL3-Enhancer Vector(http://www.promega.com/vectors/pgl3bas.txt)。

萤光素酶报告基因载体系列 pGL3，为定量具有调节哺乳动物基因表达潜在能力的各种因子的活性提供一个分析基础。这些可以是顺式或反式作用因子。经重新设计，pGL2 萤光素酶报告基因载体系列的骨架成为了 pGL3 系列载体的骨架，提高了表达量。重新设计包括对萤火虫(Photinus pyralis)萤光素酶的编码区进行修饰，使其在被转染的真核细胞中能进行最优转录活性监控。这个遗传报告基因的检测快速、灵敏并且定量准确。另外，萤光素酶报告基因载体系列具有各种不同特性，能帮助了解所研究的假设调节序列的结构特征。

1. 特点

(1) 易于使用:位于 luc^+ 基因 5′末端的 Nco I 位点允许使用这个惟一的 Nco I 位点制造与报告基因融合的蛋白。

(2) 灵活:可从位于多克隆位点区的 Sma I 位点插入平端片段于多克隆位点区,然后被其他限制性内切酶从两边切下。

(3) 多功能:在紧靠 luc^+ 基因下游创造的 Xba I 位点可促进 mRNA 3′不翻译区的插入或亚克隆蛋光素酶基因。

由萤火虫萤光素酶催化的生物发光的原理如图 7-11 所示。

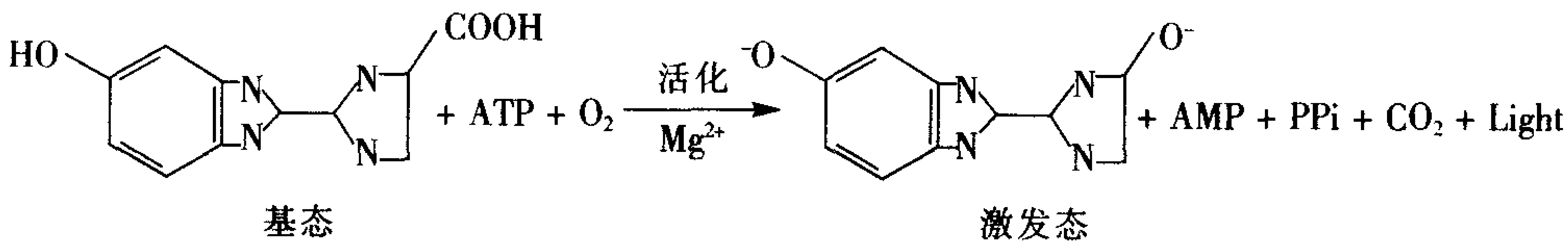


图 7-11 萤火虫萤光素酶催化的生物发光原理

这种蛋白不需要翻译后加工,所以一旦翻译立即产生报告活性。在所有的化学发光反应中,它的光产物具有最高的量子效率,因而非常灵敏。另外,在宿主细胞及检测试剂中均检测不到背景发光。

对于检测仪器,如表 7-3 所示,TurnerBiosystems 公司的 TD-20/20 型萤光发光计是一种灵敏而且多用途的萤光发光计,特别为检测应用广泛的遗传报告基因萤光素酶而设计。该型萤光发光计既可检测细胞提取物的萤光,也可检测表达萤光素酶基因的活细胞中的萤光。此萤光发光计使用菜单驱动的软件进行萤光素酶检测和普洛麦格公司的双萤光素酶报告基因检测,其样品槽配置灵活,可容纳一系列型号的试管及 35mm 培养皿,并具有宽泛的动力学范围(10^5 相对萤光强度单位[RLU],可扩展到 10^7 RLU)。仪器体积小(23.5×25×21cm),可放进狭小空间。

表 7-3 不同型号荧光光度计产品举例

荧光光度计(单样品)产品	目录号
Turner Designs Luminometer Model TD-20/20 Genetic	
Reporter Instrumentation Packge for Stabilized Assays	E2041
Turner Designs Luminometer Model TD-20/20 Genetic Reporter	
Instrumentation Package for Stabilized Assays with Printer	E2051
Turner Designs Luminometer Model TD-20/20 Genetic	
Reporter System with Single Auto Injector	E2351
Turner Designs Luminometer Model TD-20/20 Genetic	
Reporter System with Dual Auto Injector	E2361
Turner Designs Luminometer Model TD-20/20 Genetic Reporter	
Instrumentation Package with Printer, Auto Injector System	E2061

2. 操作方法

(1) 将 4 体积水加入 1 体积 5×裂解缓冲液，使用前在室温下平衡。仔细地将生长培养基从待检细胞吸出，用 PBS 漂洗细胞。此过程必须仔细，不要接触贴壁细胞。尽可能多地将漂洗用 PBS 吸出。

(2) 加入足够的 1×裂解缓冲液(CCLR, RLB 或 PLB)以覆盖细胞(例如：400μL/60mm 培养皿，900μL/100mm 培养皿或 96 孔板每孔 20μL)。如果使用 RLB，要做一次冻融循环以保证完全裂解。对于培养皿，晃动培养皿数次以保证裂解缓冲液完全覆盖细胞。将细胞从培养皿刮下，将细胞及所有的液体转移至一个离心管中，将离心管置于冰上。

(3) 旋涡震荡离心管 5～10s，然后以 12 000×g 离心 15s(室温)或 2min(4℃)。将上清液转移至一个新的试管中。

(4) 将 100μL 萤光素酶检测试剂加入萤光光度计试管中，每支试管一个样品。

(5) 将萤光光度计的程序设置为：2s 延迟及 10s 萤光素酶活性测量读数。如果有足够的光产生，读数时间可缩短。

(6) 将 20μL 细胞裂解液加入装有萤光素酶检测试剂的萤光光度计试管中，吹打或轻微旋涡震荡以混合。

(7) 将萤光光度计试管置于萤光光度计中并开始读数。如果萤光光度计未与打印机或计算机相连，记录读数。

要注意的是，在开始实验前，确定萤光光度计的光检测线形范围非常重要，因为当光强高时，萤光光度计会出现信号饱和情况。为了得到光单位与酶相对浓度相对应的标准曲线，需要使用加入 1mg/mL BSA 的 1×裂解缓冲液对萤光素酶(纯化的萤光素酶或细胞裂解液)进行系列稀释。必须加入 BSA 以避免萤光素酶因吸附而损失。

在细胞凋亡的研究中，p53 作为重要的调控因子，其自身表达水平及其作为一系列 onco-protein 的转录调节因子的分子机制一直是人们关注的焦点。这也就成为萤光素酶报告基因检测体系充分发挥作用的好场所。

第八章　流式细胞术在细胞生物学中的应用

生物界中的每一种细胞都具有自己的特征，不仅形态不同而且大小各异，或者胞内颗粒的多少不同，或者特异性表面分子也有所不同。即使是同一种细胞也可以根据细胞表面分子的特征或胞内细胞因子的分泌谱不同或其他差异，而分成不同的亚类，如 NK 细胞可以根据表明 CD56 分子表达的强度分为 CD56bright 和 CD56dim 细胞；T 细胞根据分泌的细胞因子不同分为 Th1 和 Th2 细胞等。在对各种细胞特征进行检测时可以采用免疫荧光、免疫组化以及流式细胞术等多种实验技术。其中流式细胞术能够快速高效地在单细胞水平上检测这些细胞的各种特征，同时还可以对其中某些特征进行定量检测，这是其他技术所不能比拟的。流式细胞术得到的是细胞整体量化的指标，而荧光显微镜得到的只是一个形态构象。因此流式细胞术在细胞生物学、细胞与分子免疫学等研究中已得到了广泛地应用。

第一节　检测细胞的特征

一、表型的分析

（一）原理

细胞表面通常表达大量的 CD 分子，细胞因子受体等分子，这些分子在不同的细胞表达的种类和数量是不同的，从而不同的细胞有着不同的表面分子表达谱，因此利用流式细胞仪检测细胞的表面分子表达谱可以将不同的细胞进行区分，例如 T 细胞是 CD3＋TCR＋CD56-，NK 细胞是 CD3-CD56＋。机体不同细胞之间的比例发生改变通常与疾病状态密切相关，如炎症早期，中性粒细胞增多；艾滋病病人的 CD4＋T 细胞比例减少；白血病病人整个淋巴细胞的比例都会改变，临床上的白血病的免疫学分型就是用流式细胞仪来分析的。

（二）方法

1. 制备单细胞悬液

将获得的细胞用 PBS 洗 2 遍，用 100μL PBS 重悬。

淋巴细胞可以用 Ficoll 离心法或红细胞裂解法取得；培养的贴壁细胞要经过消

化(胰酶消化可能会影响细胞表面某些分子的表达),悬浮细胞可直接使用;组织中的淋巴细胞可以用机械破碎法或酶消化法取得。流式分析所需细胞的数量,若是采用荧光直标抗体则为$(2\times10^5)\sim(3\times10^5)$,若是采用荧光二抗的间标抗体则适当增量,因为中间需要洗的次数较多。

2. 封闭

加入适量的封闭血清或非特异性的 IgG,4℃ 30min。

封闭的目的是降低非特异性吸附,因为许多细胞表面通常表达 Fc 受体,可以与 Ig 分子的 Fc 段结合。虽然 Ig 分子的 Fc 段存在种属差异,但此段蛋白质序列高度保守,不能排除跨种属结合的可能性,而且所采用的封闭血清或非特异性的 IgG 要求与所用的特异性抗体同种型,即如果所用的特异性抗体是 mouse anti-human 的抗体,则用小鼠的血清或非特异性的 IgG 做封闭;若所用的特异性抗体是 rat anti-mouse 的抗体,则用大鼠的血清或非特异性的 IgG 做封闭。此过程不需要洗涤。

3. 标记

(1) 加入适量的特异性抗体,4℃避光 30min,然后用 PBS 洗两遍。

通常采用标记二抗,若采用直标抗体,则跳过此过程。细胞标记一般是先标记需要用二抗的抗原,再进行直标抗体的标记。

(2) 加入适量的荧光标记的特异性抗体(或者二抗),或荧光标记的同型对照抗体,4℃避光 30min。

所加抗体的量与试验的细胞数、抗体的效价等有关,需要自己在试验中摸索。同型对照抗体是指与特异性抗体同种型的抗体,如:所用特异性抗体为 FITC-mouse anti-human CD3 抗体,抗体的亚型为 IgG_1,那么同型对照抗体就为 FITC-mouse IgG_1,同型对照抗体不具有抗原特异性,主要用来评估细胞本底荧光强度。

4. 检测

用 PBS 洗两遍,用 300μL PBS 重悬,上机检测。

重悬液体量与细胞数有关,若细胞数较多,可以适当增加液体量。上机检测时,PBS 中可加入 0.5% 的 Na_2N_3,以利于流式细胞仪管道的防腐。

(三) 预期结果

用流式细胞仪分析细胞首先得到细胞的固有特征,即细胞的大小和胞内颗粒的多少,这分别通过前向光(FSC, Front Scatter,表示细胞大小)和侧向光(SSC, Side Scatter,表示细胞内颗粒的多少)的数值来体现,如图 8-1 所示。淋巴细胞

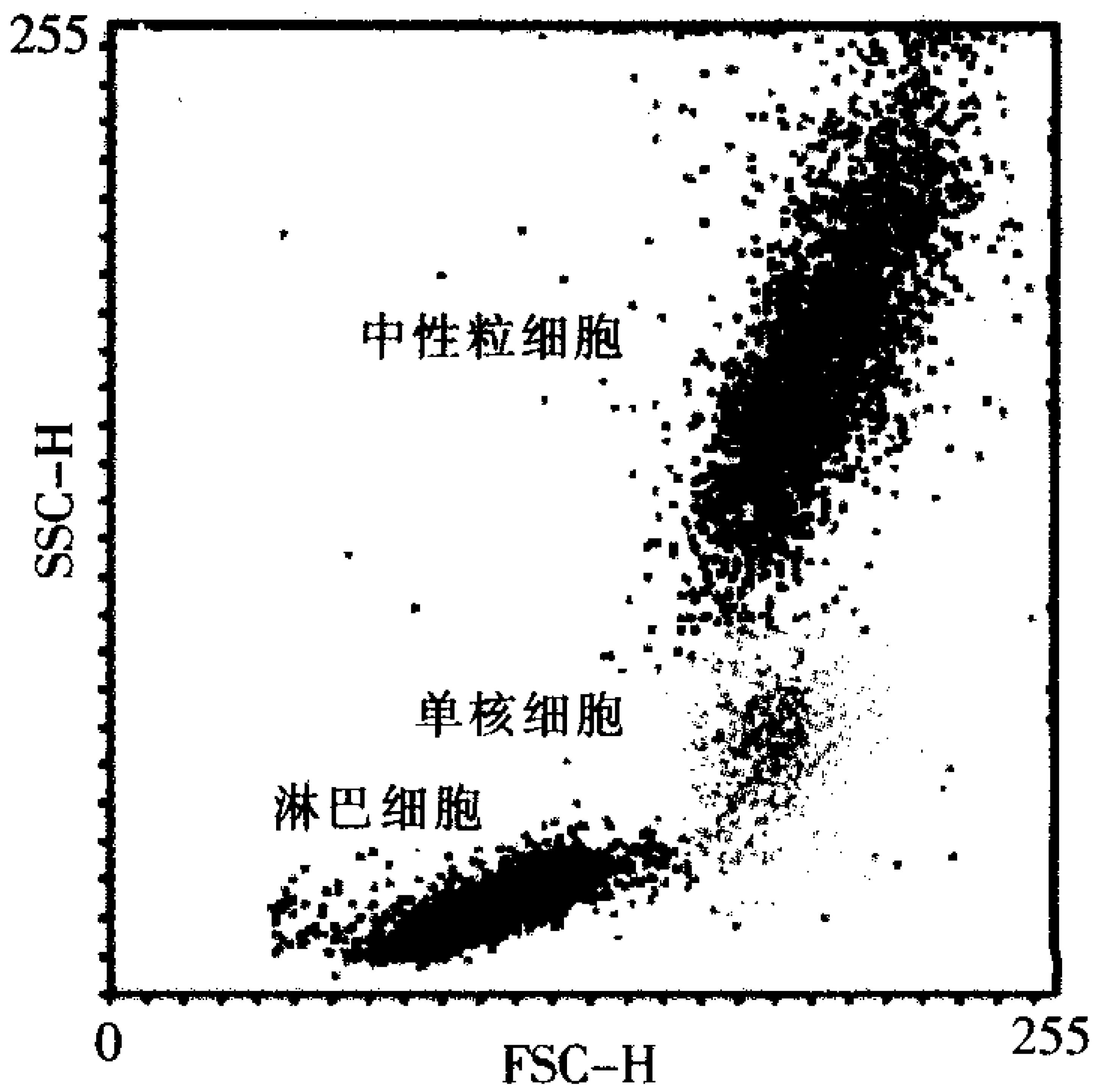


图 8-1　人外周血白细胞的流式分析结果

(Lymphocytes)体积最小,胞内颗粒最少;而中性粒细胞(Neutrophils)体积最大,胞内颗粒最多;单核细胞(Monocytes)介于两者之间。

对图 8-1 中的淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞分别进行设门,检测其中 CD3 与 CD4 的表达,可以看出 CD3 和 CD4 只在淋巴细胞中表达,而在其他两种细胞中无表达,如图 8-2 所示。

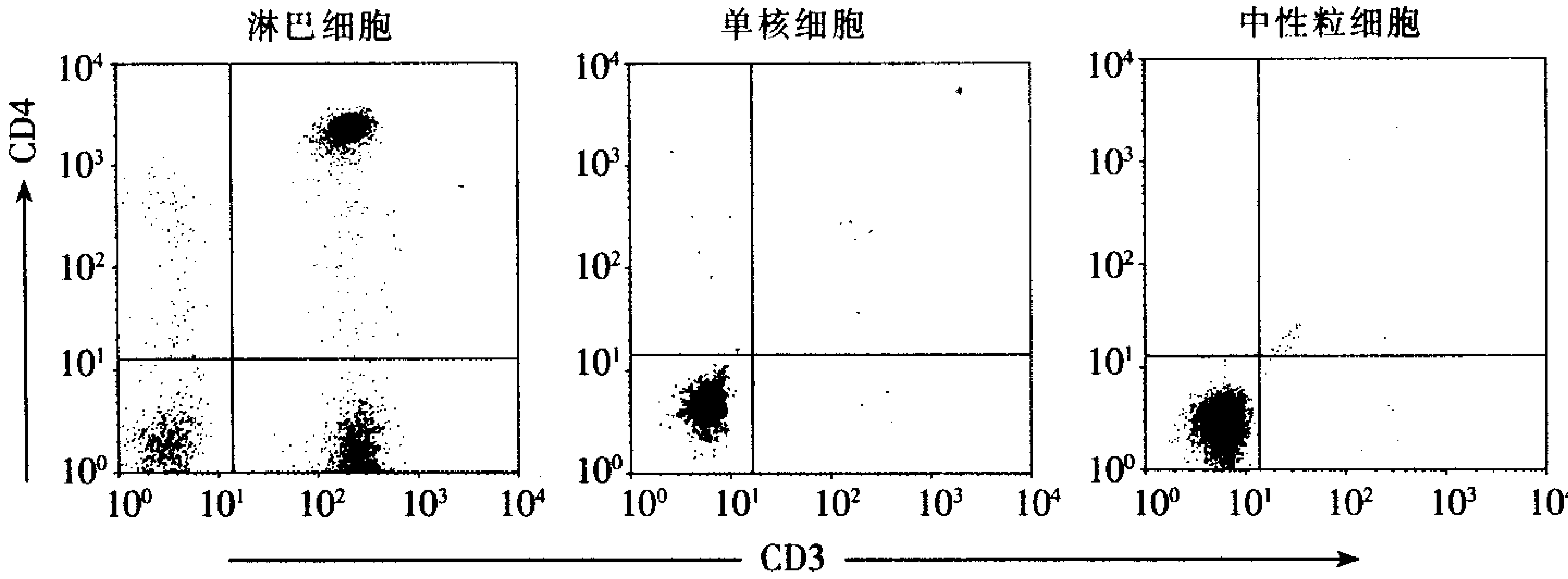


图 8-2 CD3 和 CD4 在淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞中的表达

(四)注意事项

(1)在使用流式细胞仪的检测中,除了样品检测管之外,还需要空白对照(用来调节检测电压),若使用两种以上的荧光,则需要每种荧光的单独对照(用来调节荧光间的补偿)(参考本书第十八章第六节)。

(2)若检测中使用了非直标抗体,如亲和素—生物素间标抗体、二抗等,则先染间标抗体,再染直标抗体,几种不同颜色的直标抗体可以同时染。

(3)数据分析时要对目的细胞进行设门。在通常情况下,同一类型的细胞的大小、胞内颗粒的多少近似呈正态分布,在流式细胞术中表现为聚团现象,因而比较容易将目的细胞群分离出来,这一过程称为设门。对特定细胞进行设门分析,使其结果更准确。

二、胞内蛋白的检测

(一)胞内细胞因子

1. 原理

机体内许多细胞特别是淋巴细胞,在受到外界刺激后会分泌细胞因子,来调节自身或其他细胞的功能。检测胞内细胞因子的含量,可以部分反映细胞的功能。由于在生理条件下,单个细胞内细胞因子含量较少,不容易被流式细胞仪检测到,所以通

常给与一定量的多克隆刺激剂（如 PMA），同时阻断细胞因子向胞外分泌（如 Brefeldin A 和 monensin），这样可以检测微量的胞内细胞因子。

2. 方法

（1）收集细胞，用 PBS 洗一遍，计数，用完全培养基调至 5×10^6 细胞/mL，取 1 mL加入 24 孔板中。

（2）每孔加入 1μL 1mg/mL 的 ionomycin（终浓度为 1μg/mL）和 25μL 2μg/mL 的 PMA（终浓度为 50ng/mL），同时加入 1μL 10μg/mL 的 monensin（终浓度为 10ng/mL）或者 10μL 1mg/mL Brefeldin A（终浓度为 10μg/mL），37℃、5%CO_2 孵育 4h。

PMA 为多克隆细胞刺激剂，ionomycin 为 Ca^{2+} 离子通道活化剂，它们可以活化绝大部分淋巴细胞，以增强细胞因子的分泌。Monensin 或 Brefeldin A 为蛋白质转运抑制剂，可以抑制细胞因子被释放到细胞外。细胞在 4h 的强刺激后，可能会发生凋亡，核内 DNA 释放，导致细胞粘结成团，影响检测结果，所以可以在收集细胞前，每孔加一定量的 DNA 酶，37℃、5%CO_2孵育 5～10min。

（3）收集细胞，用 PBS 洗两次，用 100μL PBS 重悬细胞，加入适量 Fc 受体阻断剂，4℃避光放置 30min。

（4）加入适量的特异性表面标记荧光抗体或独特型对照抗体，4℃避光放置 30min。

（5）用 PBS 洗两遍，用 100μL 固定液重悬细胞，常温避光放置 20min。固定液的有效成分主要为 0.5%～4%的多聚甲醛。

（6）用 PBS 洗两遍，加 200μL 穿膜液重悬细胞和适量 Fc 受体阻断剂，常温避光放置 30min。穿膜液有效成分主要为 0.1%的皂素。固定液和穿膜液都有商用试剂，可直接购买。

（7）加入适量荧光标记的胞内细胞因子抗体或独特型对照抗体，常温避光孵育 1h。

（8）用 PBS 洗两遍，用 300μL PBS 重悬细胞，上机检测。

3. 预期结果

如图 8-3 所示，这是检测外周血淋巴细胞中 IFN-r 和 IL-4 的结果，在正常情况下，IFN-r 分泌量较多（比例约 15%～40%），而 IL-4 则较少（比例约 1%～5%）。

4. 注意事项

（1）穿膜液可能会使细胞表面抗原脱落，或者使已经标记的抗体脱落，或者使抗体上的荧光发生淬灭，从而导致细胞表面的荧光量下降。

（2）PMA 和 ionomycin 的刺激是必须的，因为在自然状况下，单个细胞本身分泌的细胞因子的量很少，通常超出流式细胞仪检测下限，如图 8-4 所示。此外，Brefeldin A 和 monensin 等蛋白质转运抑制剂也是必须的，因为细胞因子在胞浆内合成后很快会分泌到细胞外，会导致胞内细胞因子含量下降，如图 8-5 所示。Brefel-

din A 和 monensin 对胞内细胞因子的检测几乎差不多，个别有少许差异，推荐使用 monensin，因为试验成本相对低些。

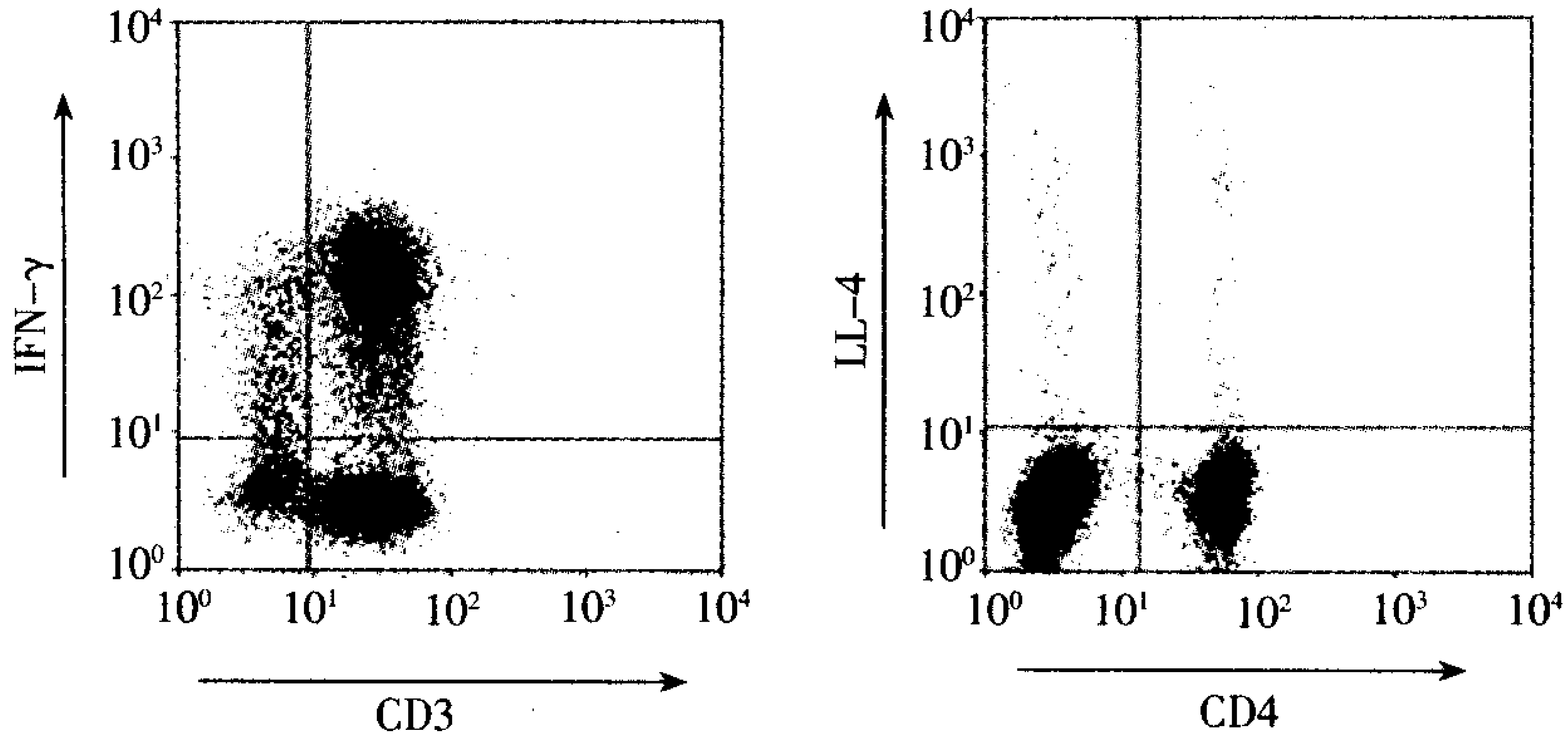


图 8-3 流式检测淋巴细胞胞内 IFN-γ 和 IL-4

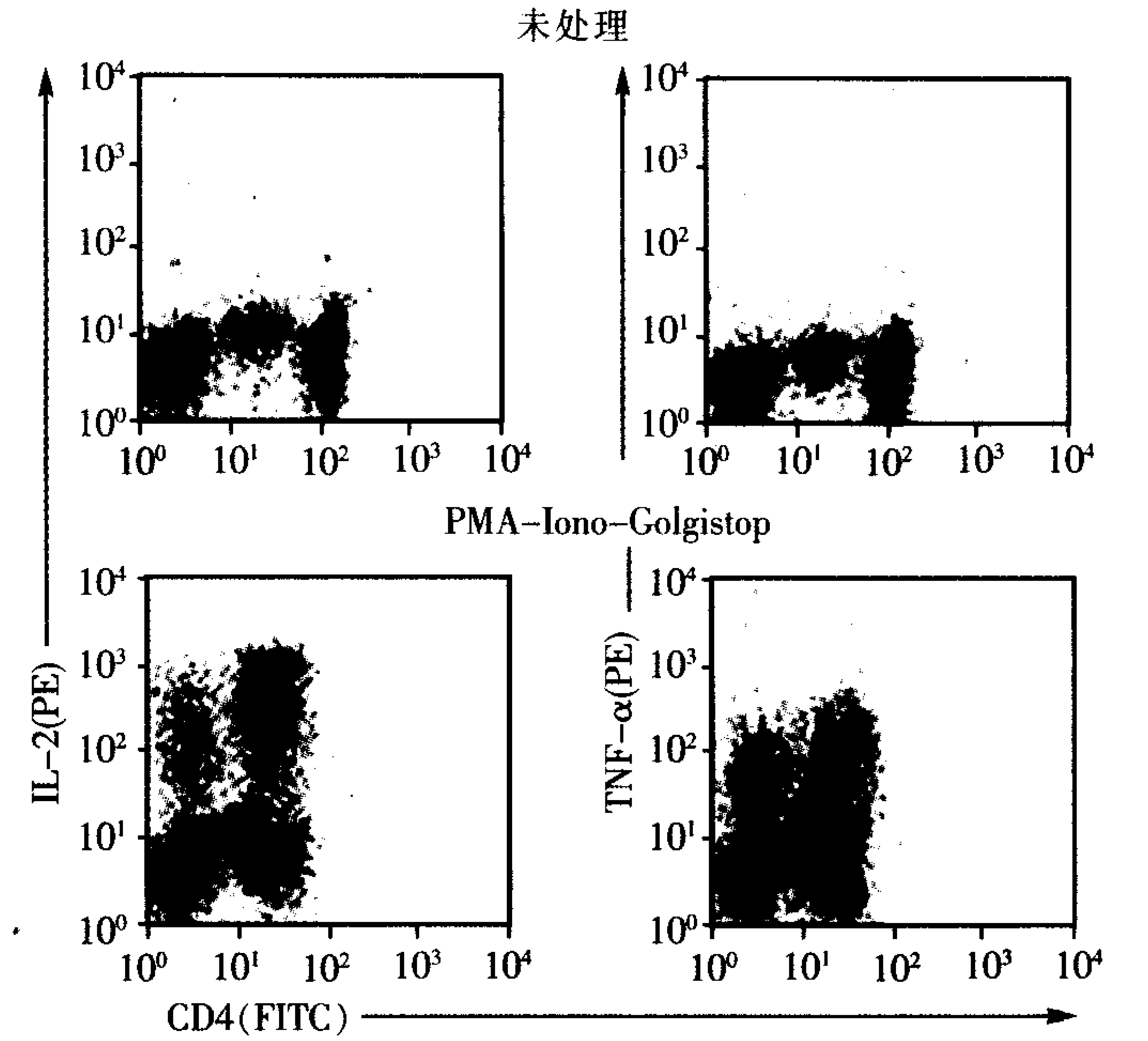


图 8-4 细胞在刺激与不刺激的状态下，细胞因子分泌量的差异

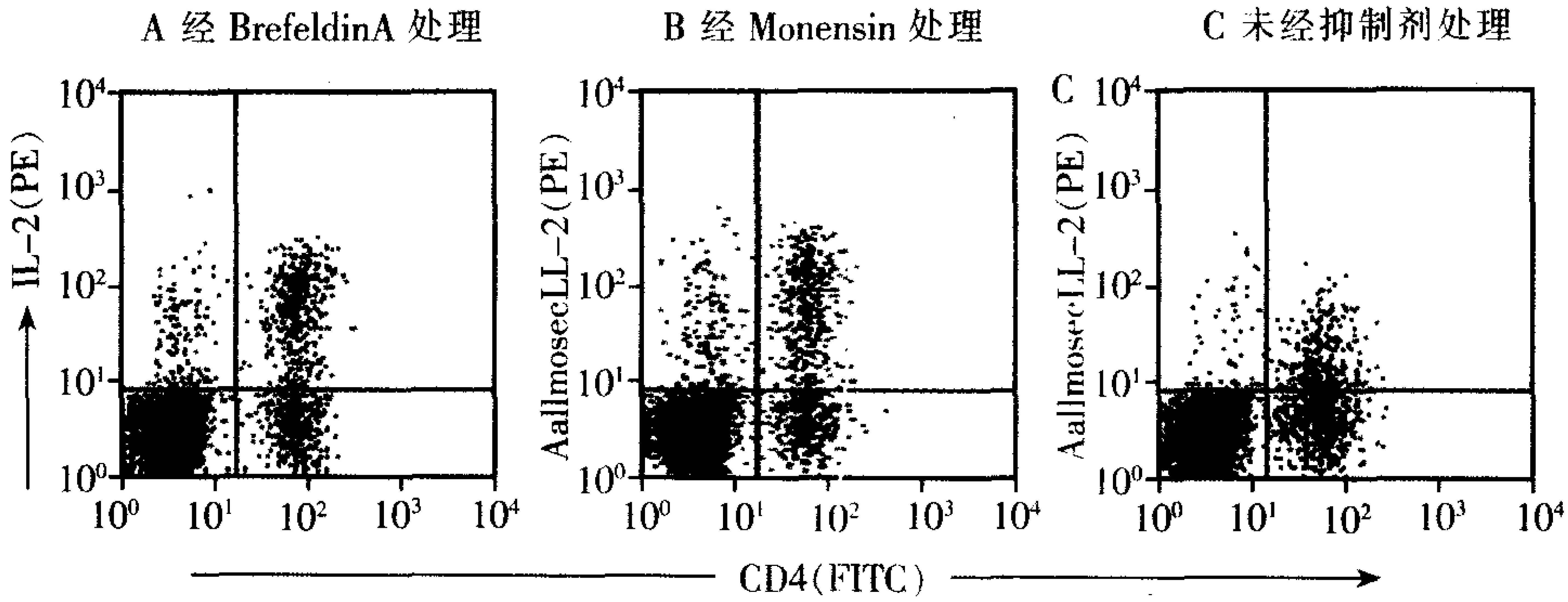


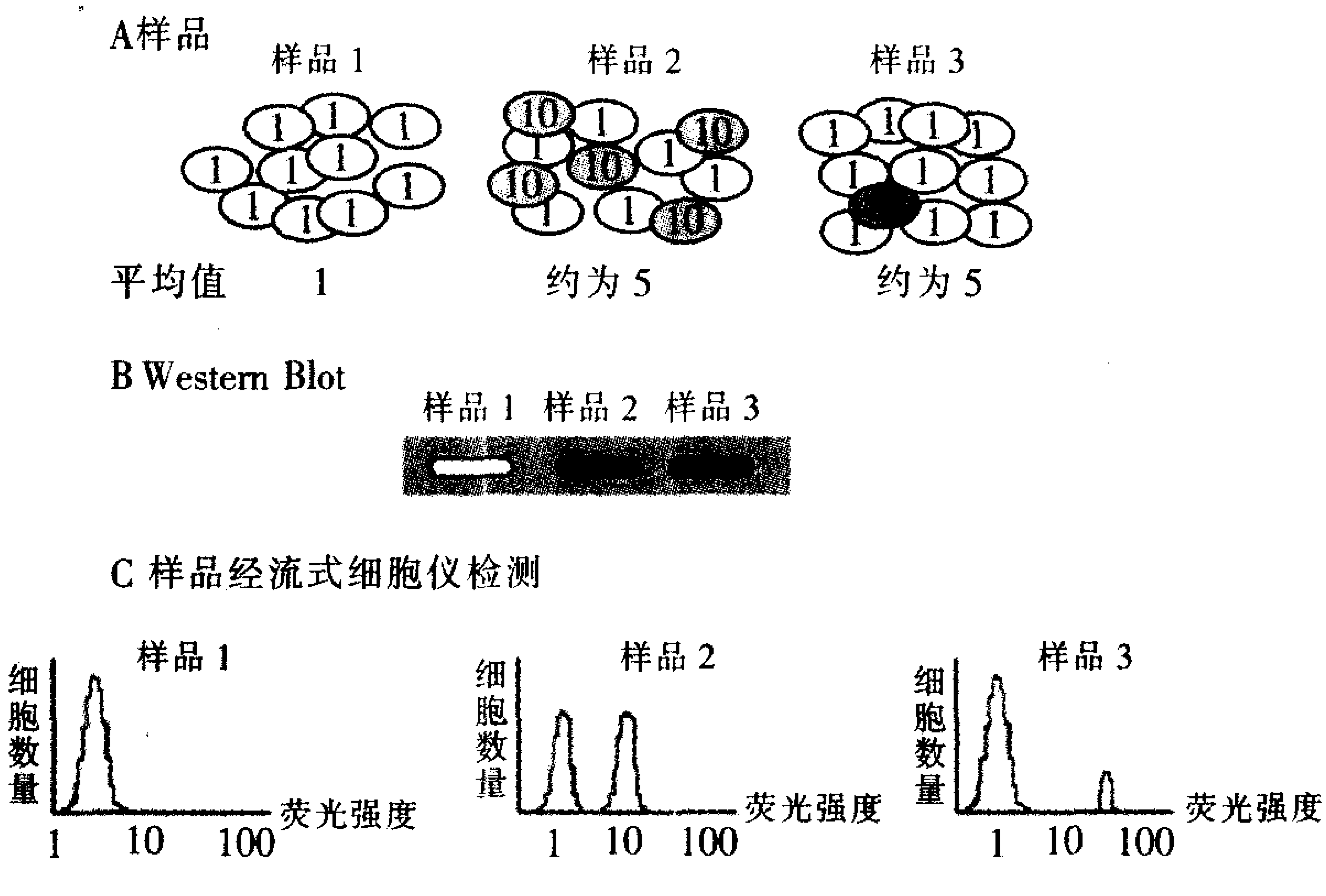
图 8-5　在胞内细胞因子检测中，蛋白质转运抑制剂对检测的影响

（二）胞内信号分子

1. *原理*

当细胞表面的受体和配体结合后，可以活化细胞内的信号通路，致使信号分子磷酸化，进一步影响目的基因的表达。这些磷酸化信号分子被特异性荧光抗体标记后，可以被流式细胞仪检测。与信号分子常用的检测方法 Western Blot 相比，流式细胞仪速度快，所需细胞量小，可以对单细胞进行定量。

例如：图 8-6 的 A 中有 3 种样品，样品 1 是空白对照，磷酸化蛋白的平均含量为 1；样品 2 是有较多的细胞发生磷酸化，而水平较弱，磷酸化蛋白的平均含量为 5；样品 3 是较少的细胞发生磷酸化，但水平较高，磷酸化蛋白的平均含量为 5。



注：A 图样品中的 1、10、50 分别指胞内磷酸化蛋白的含量

图 8-6　流式细胞术和 Western Blot 检测结果的比较

由于 Western Blot 是检测群体平均水平，所以后两种样品在 Western Blot 中几乎一样，然而在流式细胞仪当中却出现较大的差异，样品 2 是较多的细胞存在低水平磷酸化，样品 3 是较少的细胞存在高水平磷酸化。

2. 方法

(1) 常规培养的细胞，收集前 12h 换液，以保证细胞处于良好的营养状态；外周血单个核细胞分离后常规培养过夜即可用于实验。

(2) 收集细胞，用 PBS 洗两遍，重新悬浮于无血清无细胞因子的新鲜培养基，37℃、5%CO_2 温箱中孵育 2～4h。

饥饿细胞以降低信号分子的本底水平，但时间不宜过长，以防细胞启动抗凋亡机制，致使相关信号分子活化。

(3) 刺激或抑制细胞信号分子的活化。根据试验需要，加入适量的细胞因子或其他刺激剂，或者是细胞信号通路的抑制剂，刺激或抑制一段时间后，离心收集细胞，用 PBS 洗两遍。

(4) 用 100μL 固定液重悬细胞，常温避光放置 20min，用 PBS 洗两遍，去除固定液。

(5) 加入适量的特异性表面标记荧光抗体或独特型对照抗体，4℃避光放置 30min。用 PBS 洗两遍。

(6) 用－20℃冰浴的 90%甲醇重悬细胞沉淀，4℃避光孵育 10min，用 PBS 洗两遍，离心收集细胞。

甲醇兼有固定和穿膜的作用。此步骤离心转速要高于平时，因为细胞在甲醇中不易沉淀。

(7) 用 200μL 穿膜液重悬细胞，加入适量一抗或独特型对照抗体(一抗为单抗)或 rabbit IgG(一抗为多抗)，常温避光放置 1h。

(8) 用 PBS 洗两遍，用 100μL 穿膜液重悬细胞，加入适量特异性荧光标记二抗，4℃避光孵育 1h。

(9) 用 PBS 洗两遍，用 300μL PBS 重悬细胞，上机检测。

3. 预期结果

如彩图 13 所示(见彩页 4)，上图为同一浓度刺激剂在不同作用时间下对细胞的 ERK 途径磷酸化的影响，15min 最大，然后减弱。下图为不同浓度刺激剂在相同作用时间下对细胞的 ERK 途径磷酸化的影响，刺激剂浓度越大，磷酸化程度越高。

流式能够清楚地从混合细胞群体(如 PBMC)中检测出发生磷酸化的细胞群，如彩图 14 所示(见彩页 4)，在不同的刺激下，都只有 CD3＋CD4＋细胞的 ERK 才发生磷酸化。

4. 注意事项

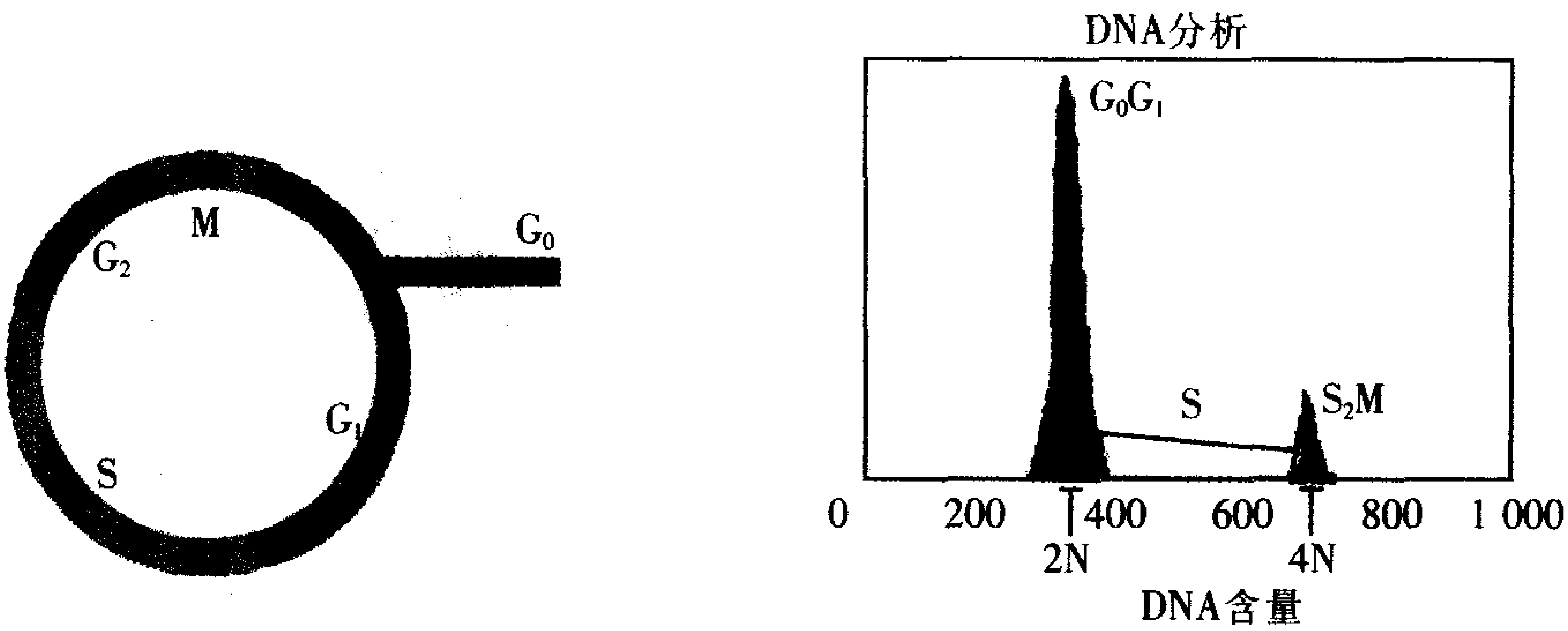
甲醇能降低标记于细胞表面的抗体的数量，导致外标荧光量的下降，可以采用先固定穿膜染内标，最后染外标的方法。但是这种方法并不适用于所有的外标抗体，因

为有的抗体不能识别固定过的抗原。

第二节　检测细胞的增殖和凋亡状态

一、用 PI 染色法分析细胞的增殖和凋亡

以有丝分裂方式增殖的细胞，从一次分裂结束到下一次分裂结束所经历的过程，称为细胞周期。它包括 DNA 合成前期(G_1 期)，DNA 合成期(S 期)，DNA 合成后期(G_2 期)，分裂期(M 期)和 G_0 期即指细胞处于阻留的状态，如图 8-7 中 A 所示。各期细胞内 DNA 的含量各不相同，G_0G_1 期细胞的 DNA 含量最少(2 倍体)，S 期 DNA 的合成量增加，G_2/M 期 DNA 含量最多，为 4 倍体期，如图 8-7 中 B 所示。细胞的增殖和凋亡是两个相反的过程，当细胞增殖时，DNA 的合成增加，而当细胞处于凋亡状态时，DNA 合成下降，而且会断裂成小的片断。检测细胞 DNA 的含量是反映细胞状态的一种方法。



A　细胞周期示意图　　　B　不同细胞周期中 DNA 含量示意图

图 8-7

碘化丙啶(propidine iodide, PI)是一种核酸染料，它可以掺入双链核苷酸中，使其发出荧光。而细胞的荧光量和胞内核苷酸的含量成正比，从而间接反映细胞的状态。

1. *方法*

(1) 常规培养的细胞，收集前 12h 换液，以保证细胞处于良好的营养状态，加入细胞刺激剂或凋亡诱导剂，再培养一段时间，收集细胞，用 PBS 洗两遍。

(2) 用 70%的乙醇重悬细胞，4℃避光放置 1～2h，其间要多次混匀，以保证细胞充分固定。

固定的样品可以在 4℃储存几周，70%的乙醇兼有固定和穿膜两种作用。

(3) 取 10^6 个细胞，用 PBS 洗两遍，以去掉乙醇。

此步离心转速要高于平时，因为细胞在乙醇中不易沉淀。

(4) 加入 50μL 100U/mL 的 RNA 酶/PBS 溶液，37℃放置 30min，以除掉 RNA 的干扰。

(5) 加入 PI 溶液(终浓度为 10μg/mL)，室温放置 30min，上机检测。

2. 预期结果

如图 8-8 所示，这是正常细胞的 PI 染色结果，包括一个高而细的 G_0/G_1 峰，一个相对平缓的 S 期平台，和一个矮而粗的 G_2/M 峰，对各个峰的面积进行拟合统计，就得出细胞处于各个细胞周期中比例。

如图 8-9 所示，这是 PI 检测凋亡细胞的结果，由于细胞凋亡时染色体 DNA 断裂成许多碎片，从而在正常的 G_0/G_1 峰前面出现一个凋亡峰，统计其面积在整体面积的比例就是凋亡细胞的比例。

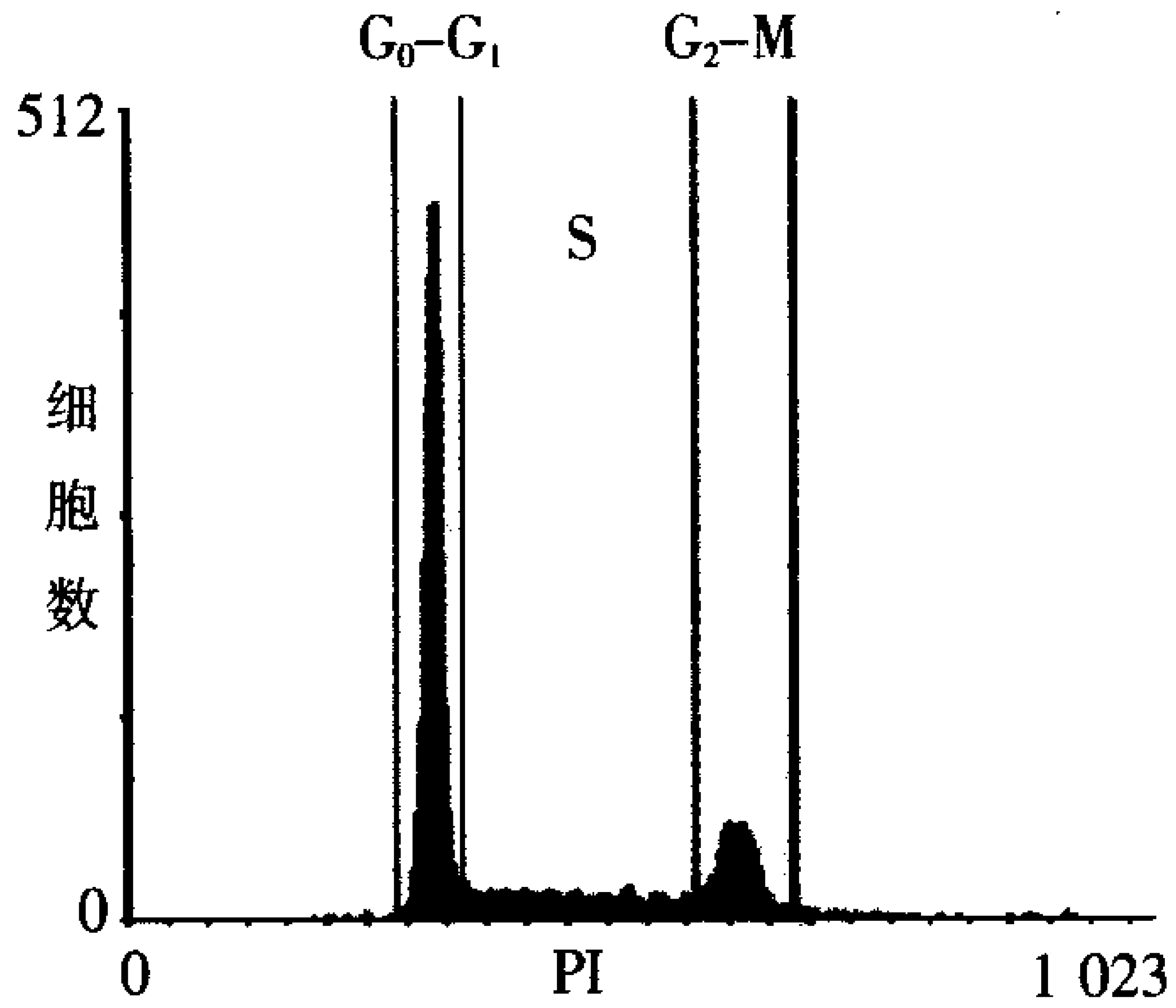


图 8-8　流式检测正常细胞周期的结果

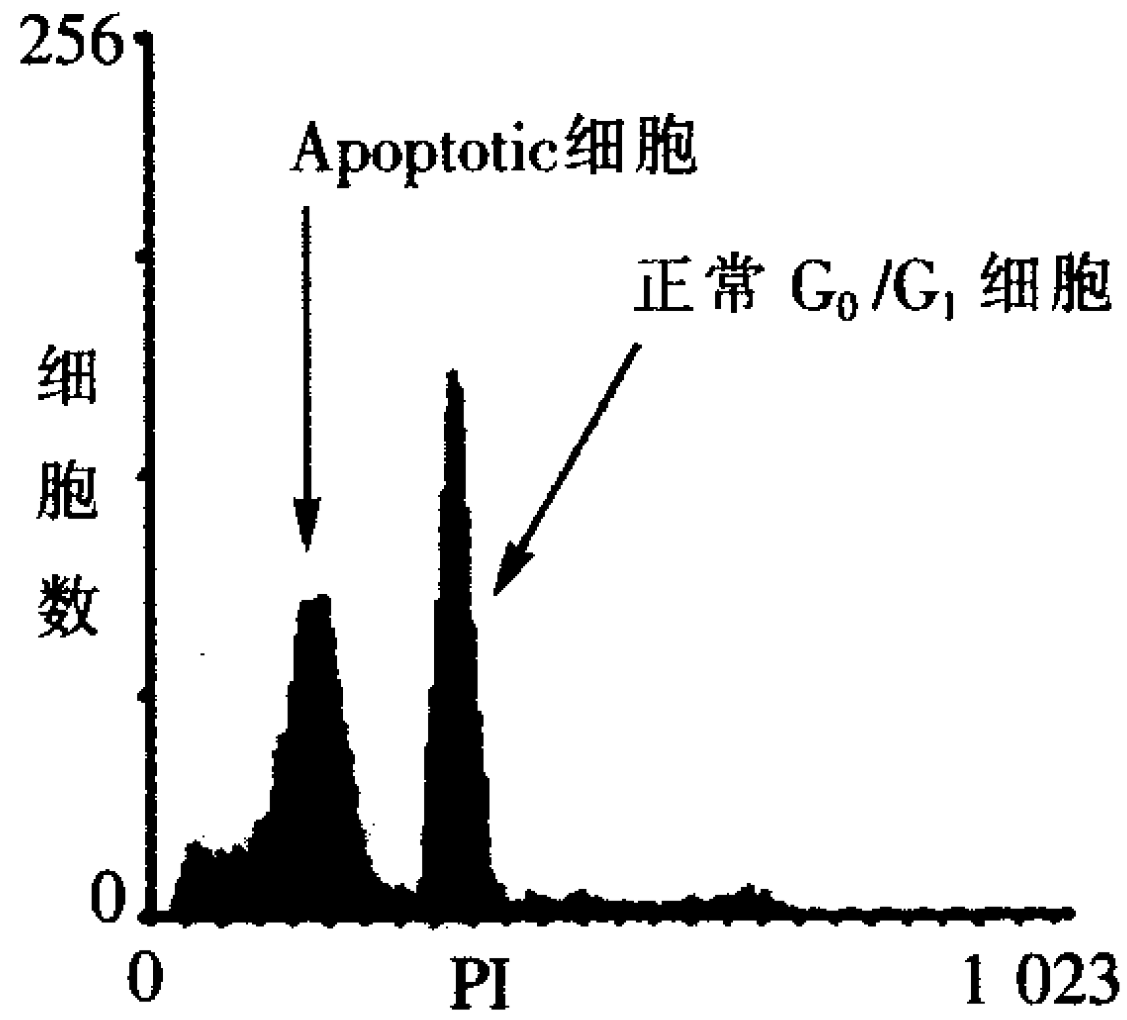


图 8-9　流式检测凋亡细胞周期的结果

如图 8-10 所示(左图为正常，右图为细胞阻滞于 G_2/M 期的结果)，这是利用细胞周期阻断剂将细胞阻滞于 G_2/M 期的结果。

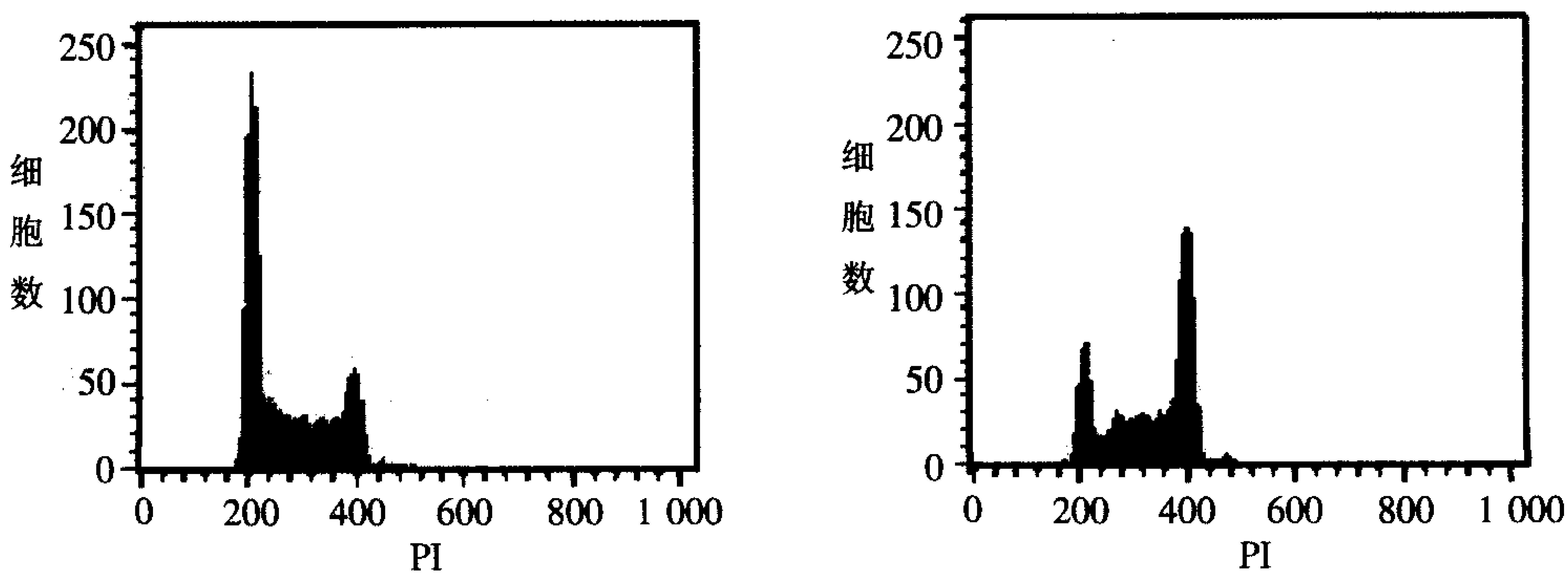


图 8-10　细胞周期被阻滞的结果

3. 注意事项

在加入 PI 前，细胞要用 RNA 酶处理。因为 PI 也可以与 RNA 部分结合，从而使检测结果反映的近似细胞整体核苷酸水平，如图 8-11 所示。

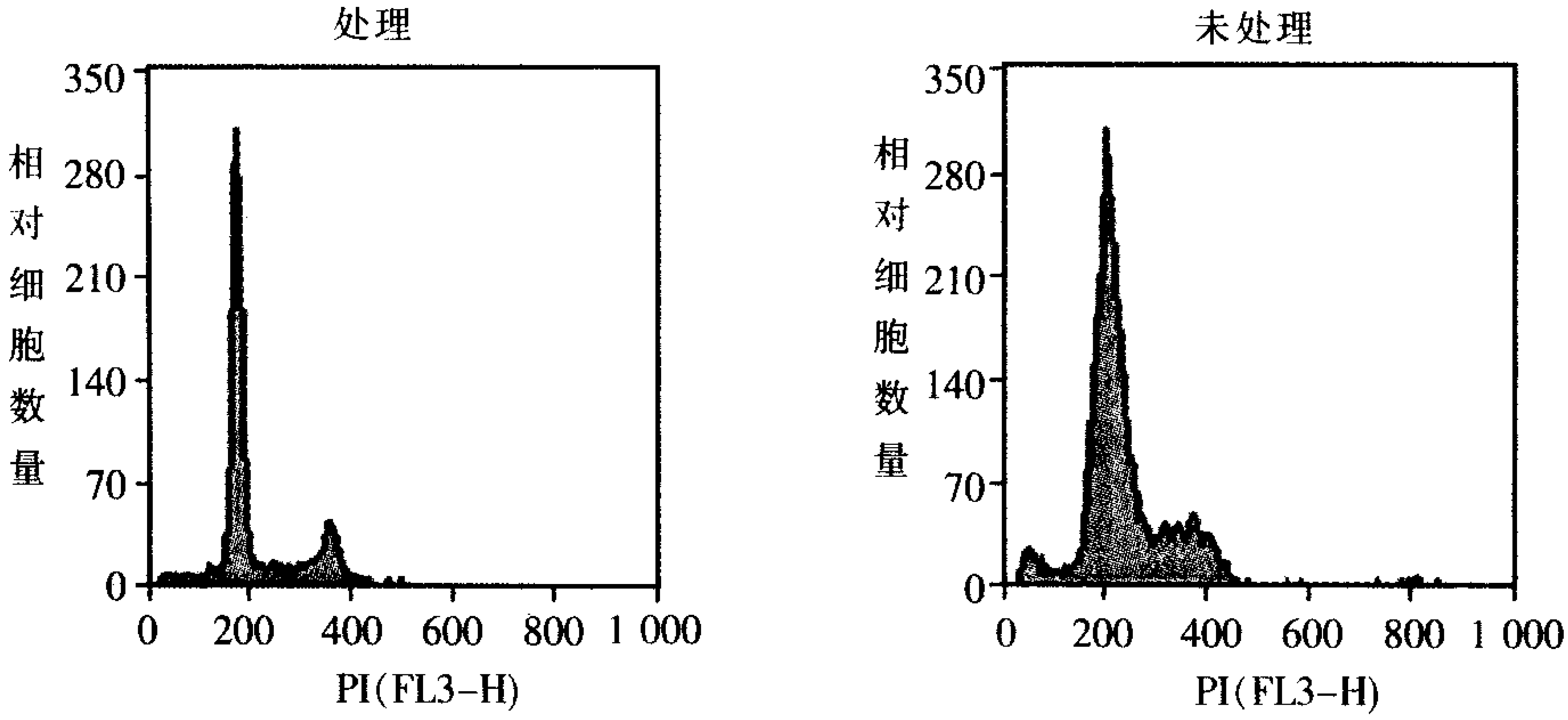


图 8-11　用和不用 RNA 酶处理细胞的结果比较

二、检测细胞凋亡 PI 和 Annexin-V

正常情况下，磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)正常位于细胞膜的内侧，但在细胞凋亡的早期，PS 可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露在细胞外环境中。Annexin-V 是一种分子量为 35～36kDa 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白，能与 PS 高亲和力特异性结合。将 Annexin-V 进行荧光素(FITC、PE)或 biotin 标记，以标记了的 Annexin-V 作为荧光探针，利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞凋亡的发生，如图 8-12 所示。

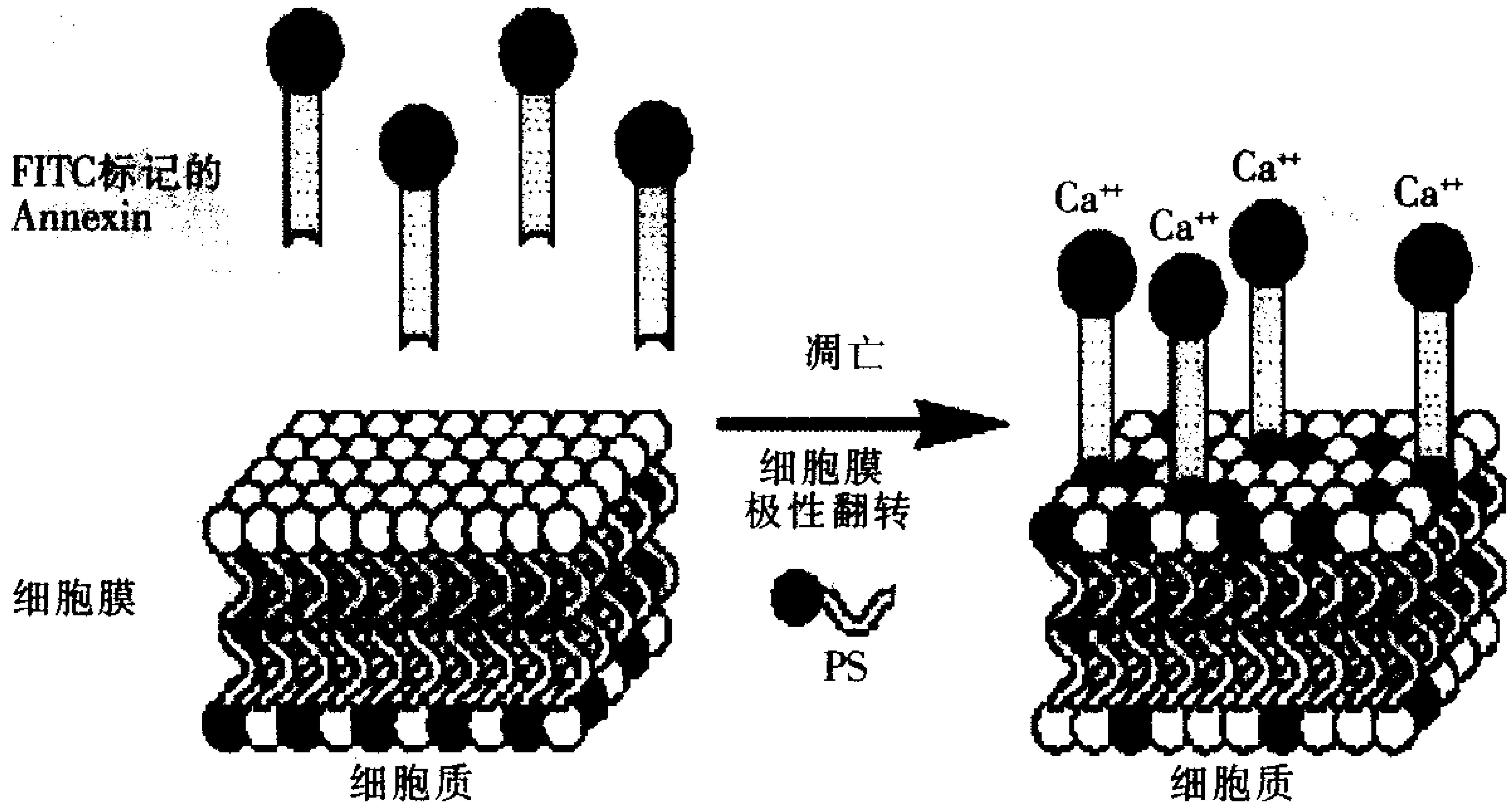


图 8-12　Annexin-V 与凋亡细胞结合示意图

碘化丙啶(PI)不能透过正常的细胞膜,但在凋亡中晚期的细胞和死细胞,PI能够透过不完整细胞膜而使细胞核染色。因此将Annexin-V与PI匹配使用,就可以将凋亡早晚期的细胞以及死细胞区分开来。

1. 方法

(1) 常规培养的细胞,收集前12h换液,以保证细胞处于良好的营养状态,加入细胞刺激剂或凋亡诱导剂,再培养一段时间,收集细胞,用PBS洗两遍。

(2) 标记细胞表面。若是细胞系,则不需要这些步骤。

(3) Annexin-V结合缓冲液洗两遍,用100μL Annexin-V结合缓冲液重悬细胞,加入适量的FITC-Annexin-V,常温避光放置15min。

Annexin-V结合缓冲液为含Ca^{2+}的PBS,Annexin-V与PS结合是Ca^{2+}依赖的。

(4) Annexin-V结合缓冲液洗两遍,用400μL Annexin-V结合缓冲液重悬细胞。

若是不需染PI,如混合细胞体系,则直接上机。若是细胞系等需要染PI,则加入PI溶液终浓度为10μg/mL,室温放置10min后上机监测(此步骤不用洗,要在1h内上机检测,因为放置时间较长,PI容易渗入细胞中,导致假阳性)。

2. 预期结果

如图8-13所示,在加入凋亡诱导剂6h后,出现Annexin-V单染细胞增多,此时细胞膜的极性发生偏转,12h后Annexin-V和PI双染细胞增多,此时细胞膜的通透性已改变。

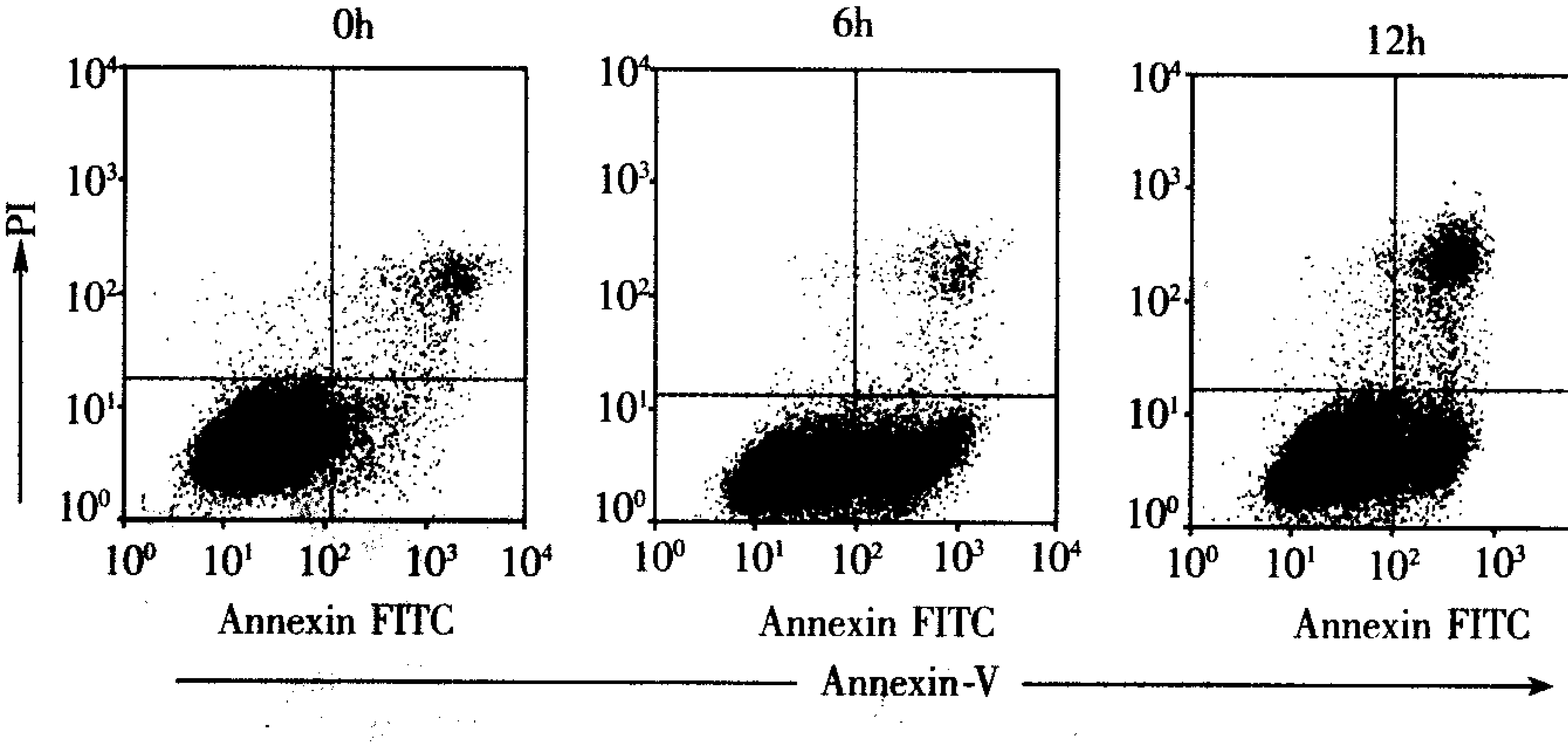


图8-13 PI和Annexin-V双染检测细胞凋亡的结果

3. 注意事项

(1) 洗液中一定要含有Ca^{2+},因为Annexin-V与PS结合是Ca^{2+}依赖的。

(2) 加入PI后不可放置过长时间,以免造成假阳性。

(3) 整个试验过程中动作要轻柔,避免对细胞造成过度的损伤。

第三节　定量检测可溶性蛋白质(CBA 技术)

长期以来，科学工作者都希望可以从单个样本中一次检测多个可溶性的目的蛋白，并且获得高精确度的数据。虽然常规的蛋白分析方法很多，如 ELISA，Western Blot 等，但是 Western Blot 只能做到半定量，ELISA 一次反应只能监测一个指标。如果检测多个指标要消耗大量样本，而且分批操作导致组间差异增大，从而使数据的可靠性降低。近来，BD 公司推出了一种基于流式细胞仪检测平台的液相多重蛋白定量技术(Cytometric Bead Array，CBA)。它是利用一系列荧光强度不同的微球，同时分析样本中多种可溶性成分的检测方法。每种 CBA 微球大小一致，分别具有特定的荧光强度，并且包被有适用于特定分析(如其他抗体或可溶性蛋白)的特异性抗体，提供了类似 ELISA 孔板类似的捕获表面，可检测特异性的目的蛋白。与 ELISA 相比，CBA 最重要的特点是能同时检测单一样本中的多个目的蛋白、检测所需样本量小、灵敏高度高。

1. 原理

CBA 是将不同的捕获抗体(capture antibody)包被在不同荧光强度的微球(beads)上形成捕获微球(capture beads)，捕获微球和待测样品溶液混合后，微球上的特异性抗体就与样品中相应的抗原或蛋白结合，再加入荧光标记的检测抗体，形成“三明治”夹心复合物，就可以被流式细胞仪检测，如图 8-14 所示。

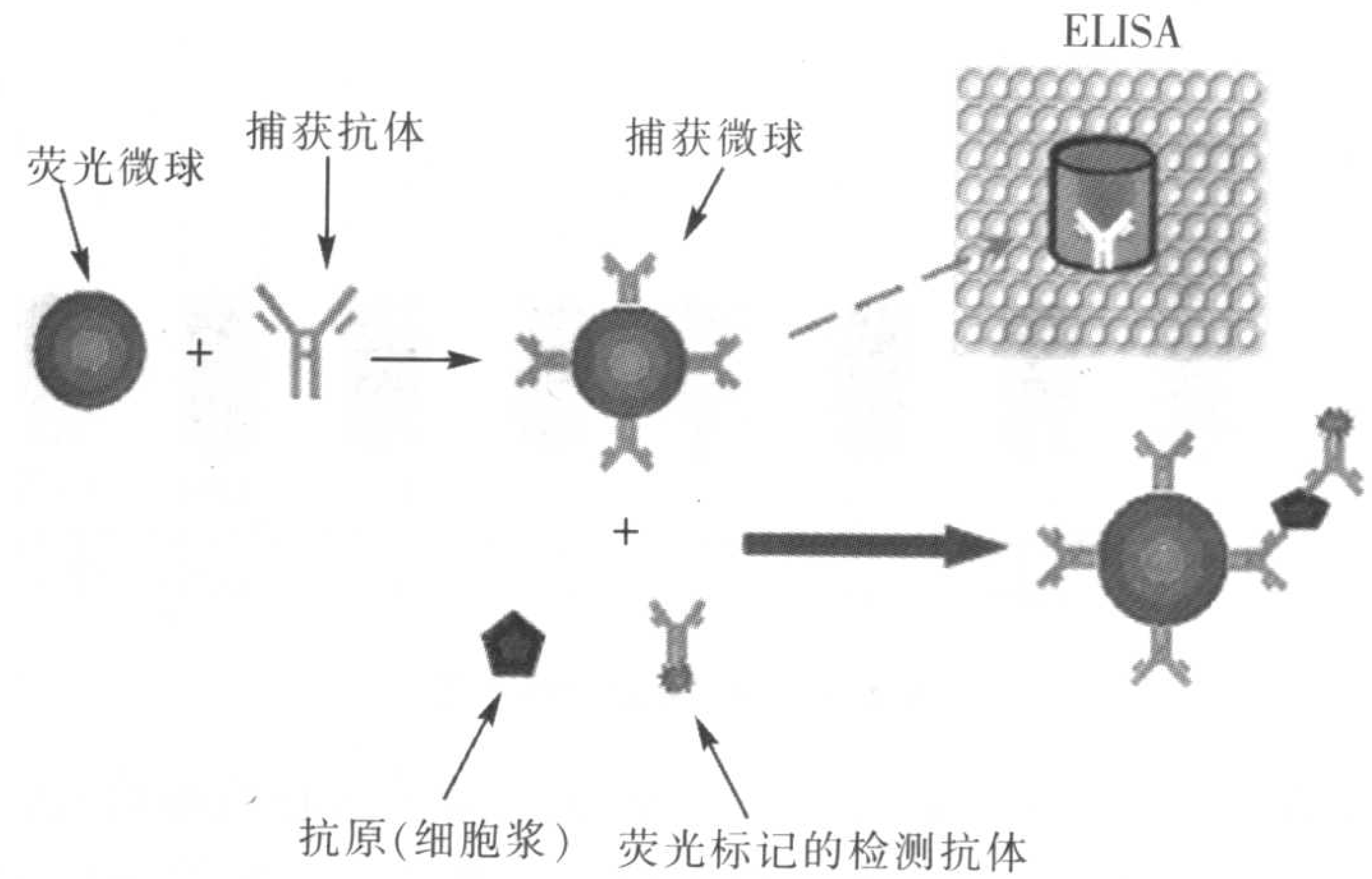


图 8-14　CBA 检测原理示意图

CBA 的每种微球携带有一种或多种不同强度的荧光，在流式细胞仪的荧光检测通道内通过检测微球荧光强度的差异对目的蛋白定性；检测抗体带有另外颜色的荧光，通过检测其荧光信号的强度来定量目的蛋白，如图 8-15 所示。CBA 的每种微球带有两种不同强度的荧光，如彩图 15 所示(见彩页 4)，在流式细胞仪两个荧光检测

通道上表现出不同的一系列的点，从而形成了可同时检测几十种甚至上百种目的蛋白的阵列(Array)。

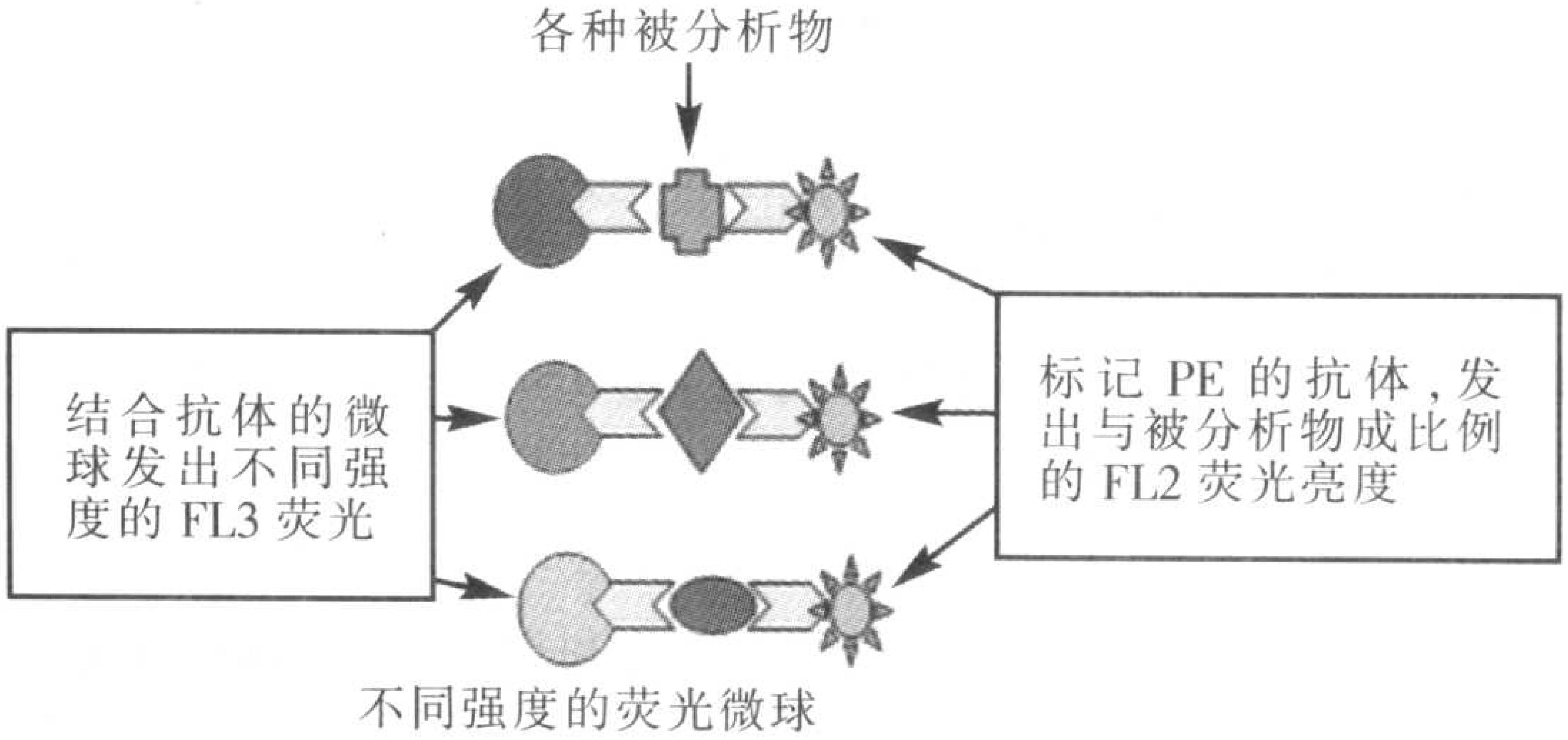


图 8-15 CBA检测同时多种抗原示意图

2. 方法

(1) 常规培养的细胞，收集前12h换液，以保证细胞处于良好的营养状态，加入细胞信号刺激剂或抑制剂，再培养一段时间，收集细胞，用PBS洗两遍。

(2) 提取样品细胞的胞浆蛋白，稀释成合适的浓度，如图8-16所示。

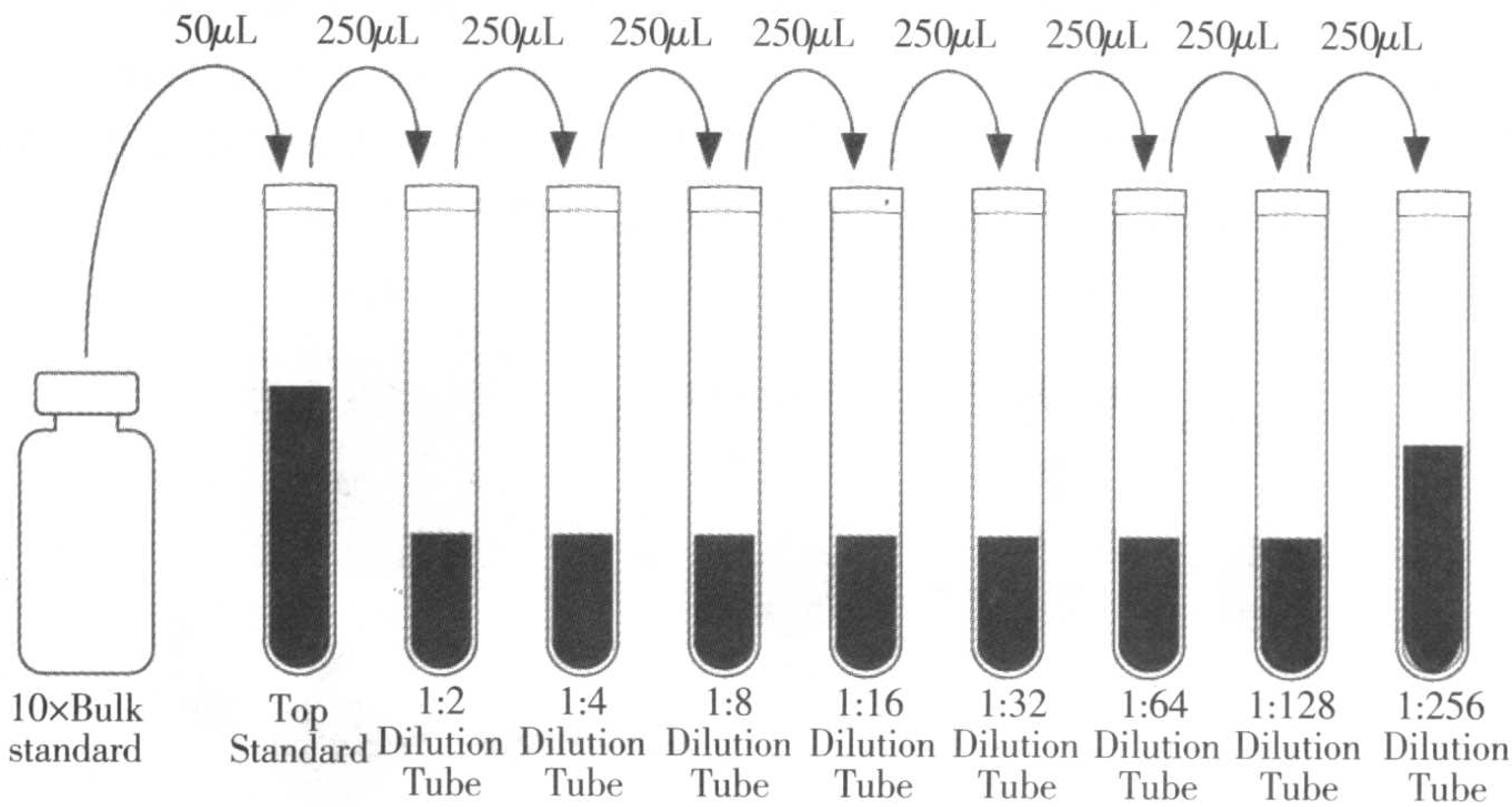


图 8-16 标准品稀释方法

通常采用含去污剂(如Triton X-100等)的裂解液来提取细胞或组织的胞浆蛋白，提取的胞浆蛋白可保存于−70℃，以备以后检测所用。胞浆蛋白的含量应大于1mg/mL，各种细胞的胞浆蛋白的含量不完全相同，要在具体的试验中估计。如Jurkat细胞系的含量大约为100～200μg/10^6 细胞，而PBMC大约为20～50g/10^6 细胞。

(3) 按一定的浓度和比例，用样品稀释液稀释标准品。

(4) 在每个样品加入适量的捕获微球(带有被第三和第四通道检测的荧光)和检

测抗体(PE 标记),充分振荡混匀,室温避光 4h。

捕获微球使用前要振荡混匀,因为微球常沉于管底。

(5)用 wash buffer 洗一遍,8 000rpm,5min,用 300μL wash buffer 重悬,上机检测。

上机前要用标准微球对机器的电压和补偿做调节。

3. 预期结果

(1) 先测定不同浓度的标准品的荧光强度,得到其平均荧光密度(MFI),由标准品的浓度和 MFI 值作出标准曲线(纵横坐标轴都为对数),如图 8-17A、8-17B 所示。

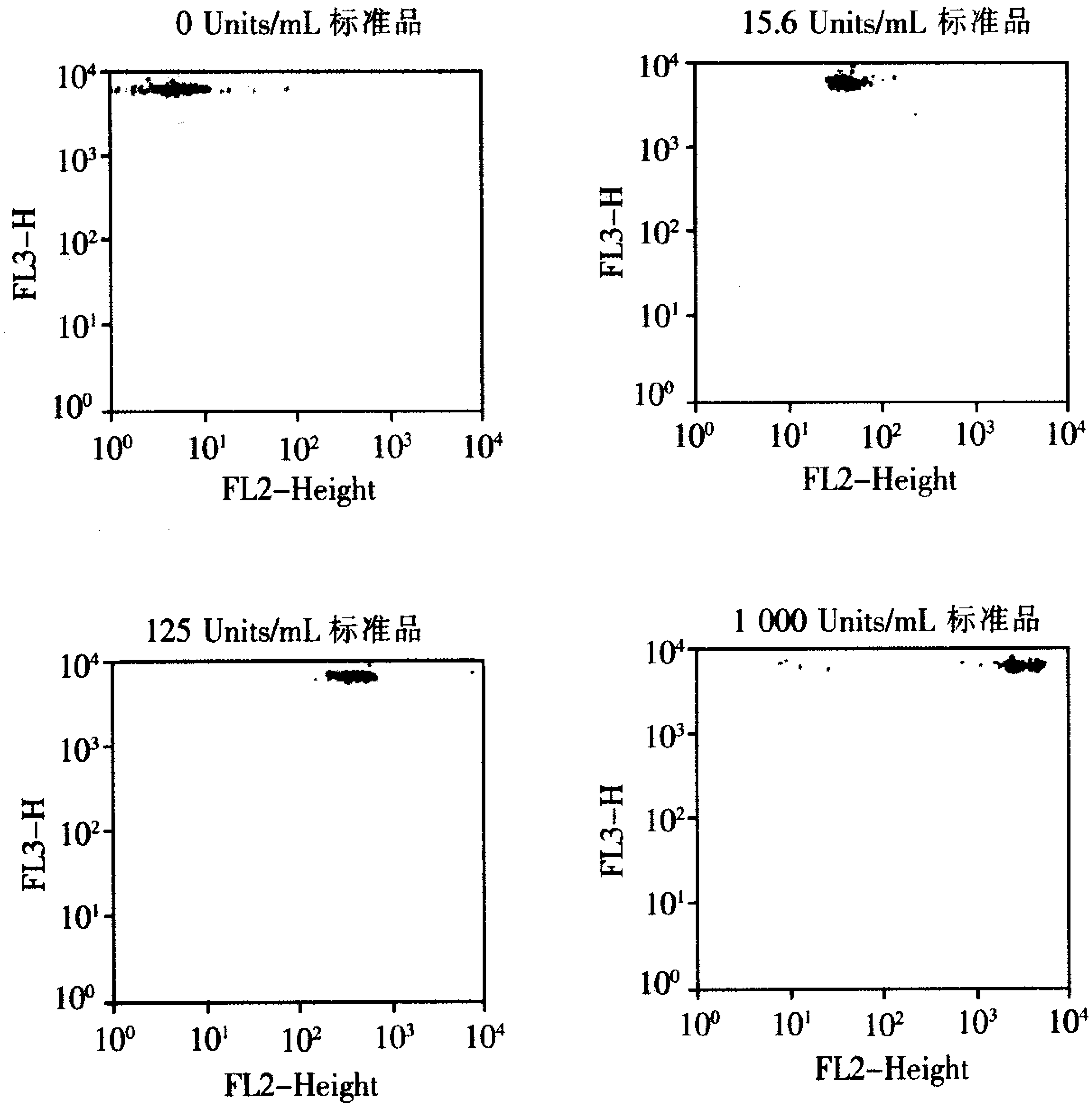


图 8-17A 流式检测不同浓度的标准品的荧光强度

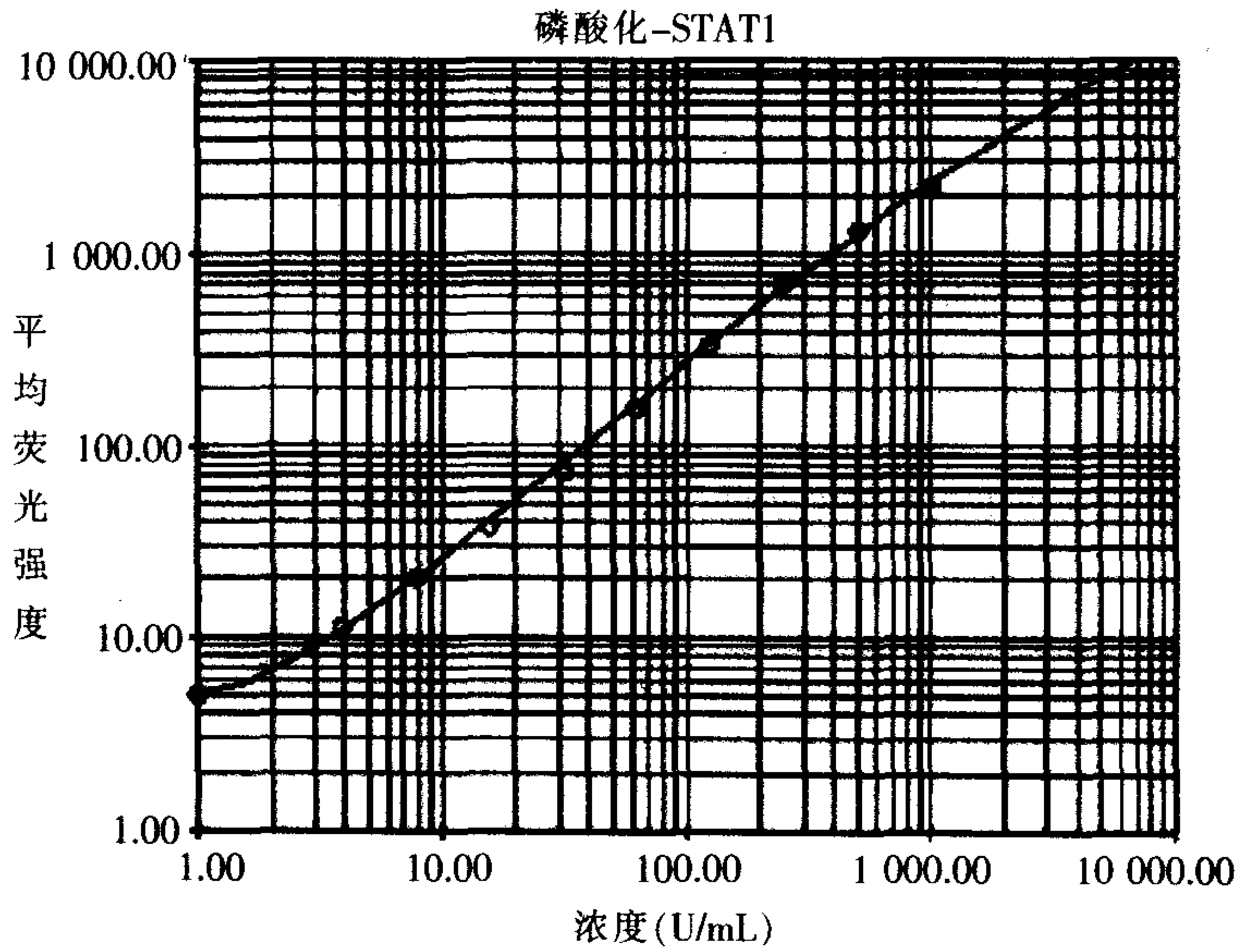
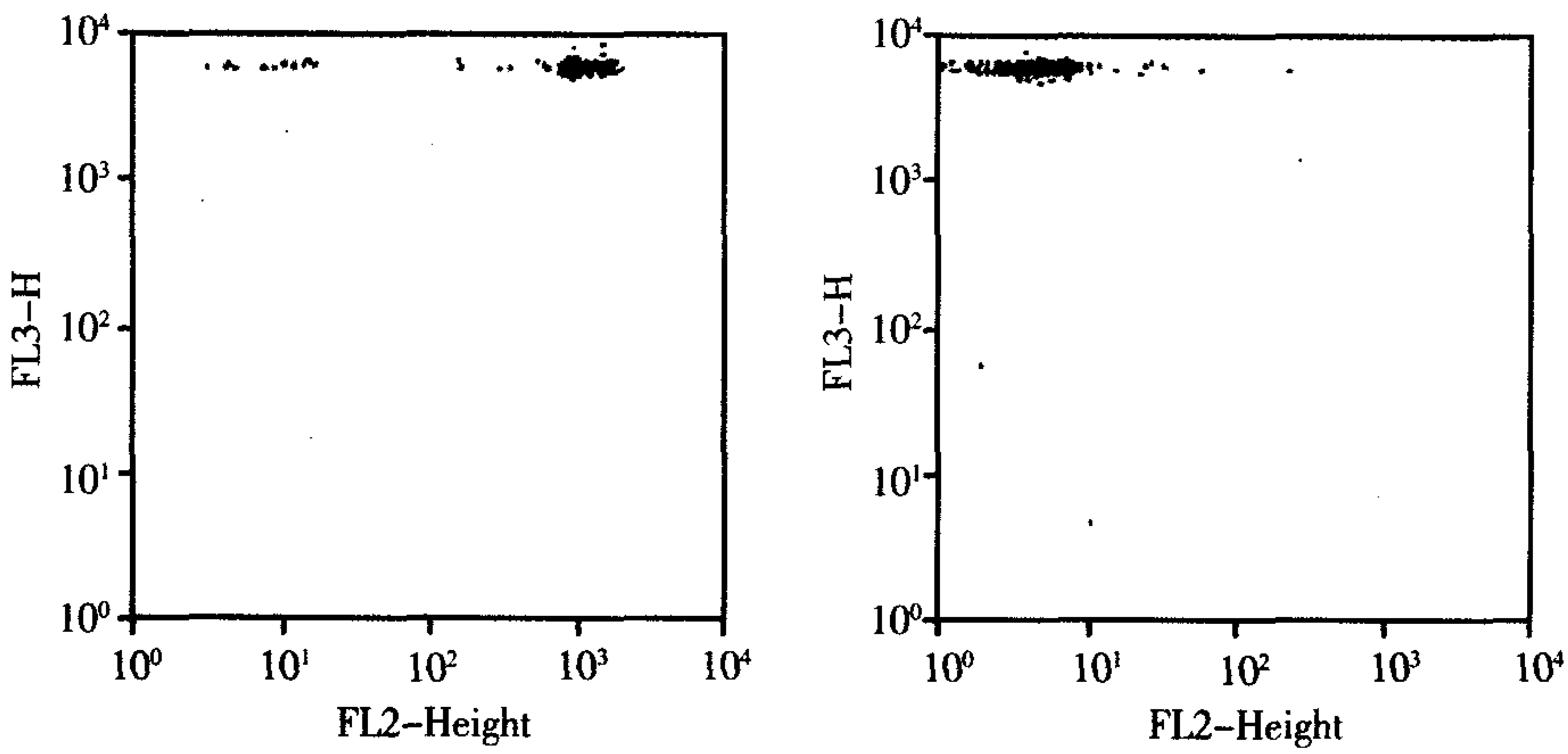


图 8-17B 由不同浓度的标准品的荧光密度做出的标准曲线

(2) 检测样品的 MFI 值,然后在标准曲线中查出相对应的浓度,如图 8-18 所示。



Results

					Phospho-STAT1		
	Filename	SampleID	Acq Date	Dilut Factor	FL2 MFI	Tube Units/mL	Sample Units/mL
1	011503t. 024	10μg Jurkat Lysate	15-Jan-03	1	5.0	≤0	
2	011503t. 028	10μg Jurkat+perv	15-Jan-03	1	973.4	381.0	381.0
3							
4							

图 8-18 不同样品的检测结果及定量分析

第四节　纯化特定的细胞

一、原　　理

在细胞生物学研究中，研究者常常需要对单一细胞的特性进行检测分析，这就需要将某一特定细胞从一个混合体系中分离纯化出来，如将 NK 细胞从淋巴细胞分离纯化出来。分离纯化的细胞要有较高的纯度(>95%)，而且基本保持原有的活性，能够在进一步的功能实验中使用。常规的物理法(不连续密度梯度离心)不可能达到较高的纯度；化学法(抗体清除等)又对细胞活性有损害，且纯度不够；磁珠法虽然可以在纯度和活性上达到要求，但它只能做到单参数的分选(最多是双参数，但影响活性)。

流式细胞仪利用对目的细胞液滴加电荷，然后利用电场的作用，使加电的细胞发生偏转，来纯化特定细胞。流式细胞仪纯化细胞相对于其他方法具有高速(理论峰值为 3 万个/s)、高纯度(>98%)、多参数(流式能检测的所有参数都可以用来做分选指标，可以将其进行多种组合，从而分选出不同的细胞)等特点。

加电的细胞液滴在电场中发生偏转的，被不同的接受管所接受，从而纯化细胞，如彩图 16 所示(见彩页 5)。

二、方　　法

(1) 常规细胞染色(见本章第一节)，或经 GFP 等荧光载体转染的细胞。

(2) 流式分选。整个过程与分析时相同，只不过将分析得到的某些特定细胞群分选出来。

三、预期结果

如图 8-19 所示，这是利用流式细胞仪将 PBMC 中 CD56bright 和 CD56dim 细胞纯化的结果。

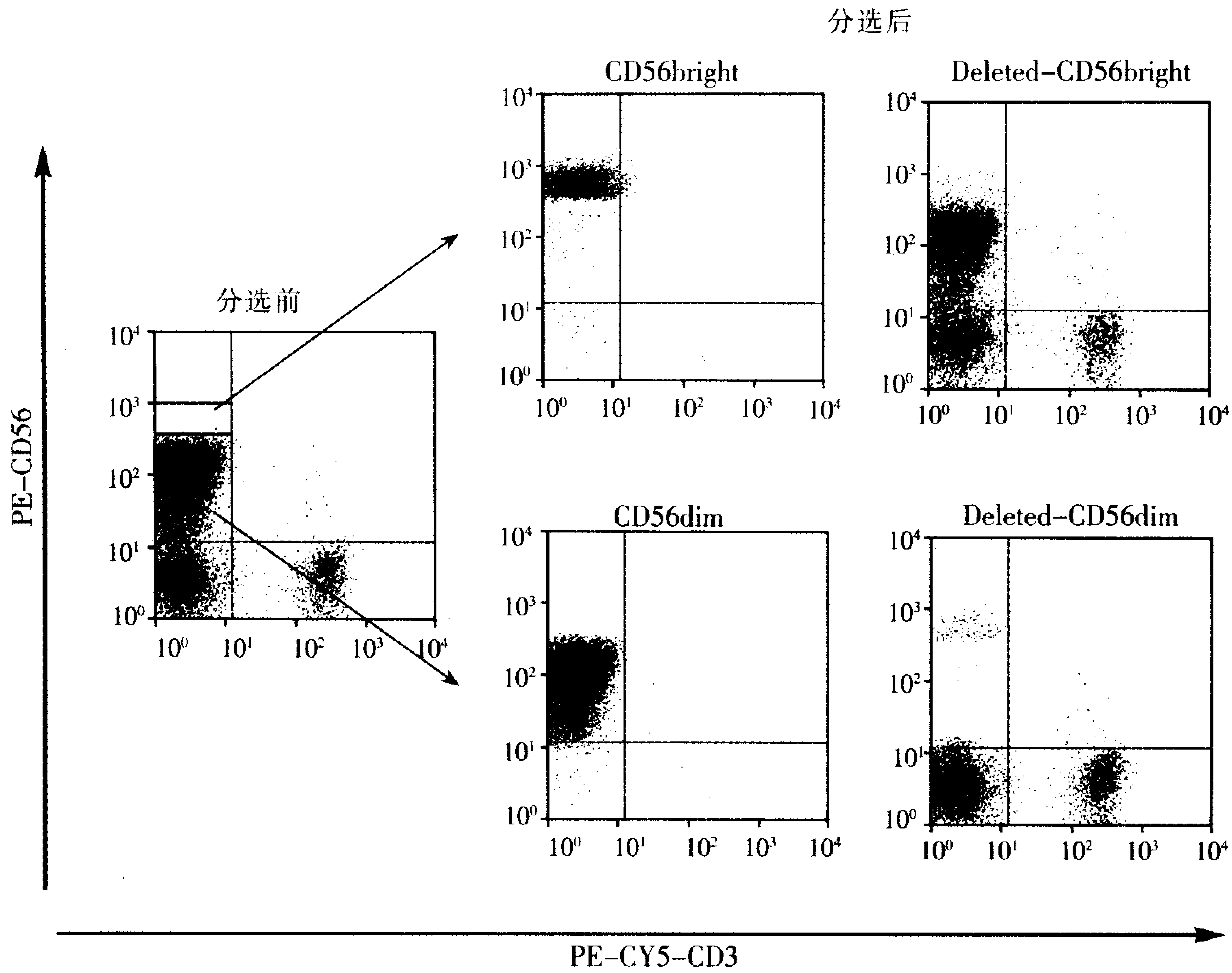


图 8-19 流式分选 CD56 bright 和 CD56 dim 细胞的结果

四、注意事项

(1) 保证整个过程中的无菌操作。

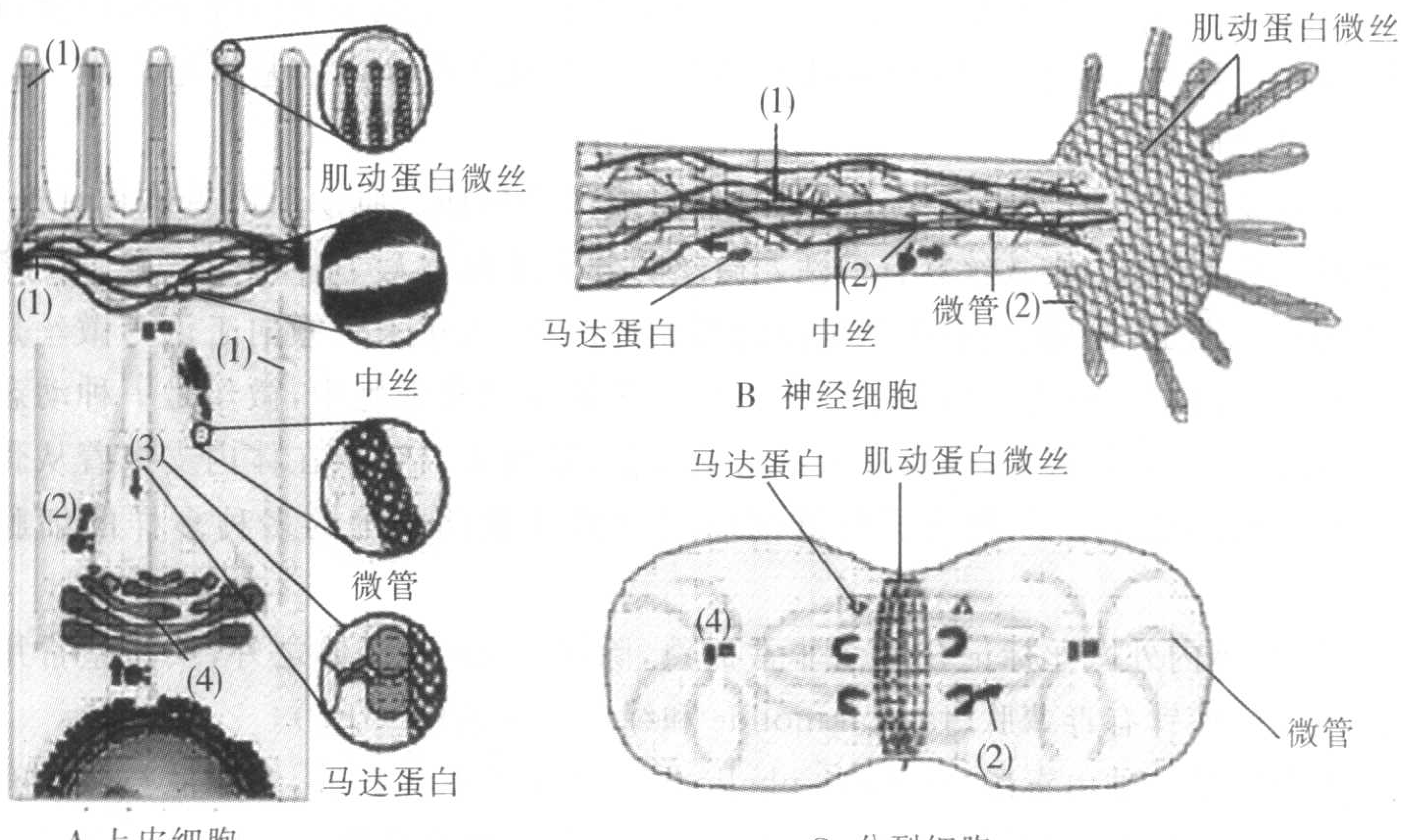
(2) 仪器操作者要调好液流和延迟。

第九章　荧光在细胞骨架研究中的应用

细胞骨架(cytoskeleton)是指真核细胞中的蛋白纤维网络结构。由于光学显微镜的分辨率的限制，直到 20 世纪 60 年代后，人们才逐渐认识到细胞骨架的客观存在。

细胞骨架由微丝(microfilament)、微管(microtubule)和中间纤维(intemediate filament)构成。微丝确定细胞表面特征，使细胞能够运动和收缩；微管确定膜性细胞器(membrane-enclosed organelle)的位置和作为膜泡运输的导轨；中间纤维使细胞具有张力和抗剪切力。微丝、微管和中间纤维位于细胞质中，又称胞质骨架，它们均由单体蛋白以较弱的非共价键结合在一起，构成纤维型多聚体，很容易进行组装和去除组装，这正是实现其功能所必需的特点。

细胞骨架(如图 9-1 所示)不仅在维持细胞形态、承受外力、保持细胞内部结构的有序性方面起重要作用，而且还参与许多重要的生命活动，如在细胞分裂中细胞骨架牵引染色体分离；在细胞物质运输中，各类小泡和细胞器可沿着细胞骨架定向转运；在肌肉细胞中，细胞骨架和它的结合蛋白组成动力系统；在白细胞的迁移、精子的游动、神经细胞轴突和树突的伸展等方面都与细胞骨架有关。另外，在植物细胞中，细



(1)结构与支撑　(2)胞内运输　(3)收缩与运动　(4)空间组织

图 9-1　细胞骨架示意图

胞骨架指导细胞壁的合成。

广义的细胞骨架还包括核骨架(nucleoskeleton)、核纤层(nuclear lamina)和细胞外基质(extracellular matrix),它们互相牵连,形成贯穿于细胞核、细胞质、细胞外的一体化网络结构。

第一节 荧光技术在微丝骨架研究中的应用

一、概 述

微丝,又称肌动蛋白纤维(actin filament)或纤维形肌动蛋白(F-actin),是指真核细胞中由肌动蛋白(actin)组成,直径为7nm的骨架纤维。肌动蛋白是微丝的结构成分,分子量为43kDa。肌动蛋白单体外观呈哑铃状,存在于所有真核细胞中,肌动蛋白在真核细胞进化过程中相当保守,肌动蛋白基因家族编码许多结构相关而功能迥异的蛋白亚型,它们调节肌肉组织的收缩,且控制着非肌肉细胞的形态与运动。在哺乳动物和鸟类细胞中至少已分离到6种肌动蛋白,4种称为α-肌动蛋白,分别为横纹肌、心肌、血管平滑肌和肠道平滑肌所特有,另两种为β-肌动蛋白和γ-肌动蛋白,见于所有肌肉细胞和非肌肉细胞胞质中。不同类型肌肉细胞的α-肌动蛋白分子一级结构(约400个氨基酸残基)仅相差4~6个氨基酸残基,β-肌动蛋白或γ-肌动蛋白与α-横纹肌肌动蛋白相差约25个氨基酸残基。显然这些肌动蛋白基因是从同一个祖先基因进化而来。

微丝是由球形肌动蛋白(G-actin)单体形成的多聚体。肌动蛋白单体具有极性,装配时呈头尾相接,故微丝具有极性。微丝的分子结构尚无定论,传统理论认为微丝是由两条肌动蛋白单链呈右手螺旋盘绕形成的纤维,近年来则倾向于认为微丝是由一条肌动蛋白单体链形成的右手螺旋。在大多数非肌肉细胞中,微丝是一种动态结构,持续进行组装和解聚,通过这种灵活的重排,肌动蛋白骨架在体内支撑着从骨骼肌刚性的肌动球蛋白阵列到成纤维细胞运动的片状伪足等的多种多样的细胞内结构。

目前,体内外微丝标记技术已非常成熟,除了actin的抗体之外,实验室常用的标记微丝的探针有毒蕈肽、Jasplakinolide和绿色荧光蛋白(GFP)。

毒蕈肽是一种由毒蕈(amanita phallodies)产生的双环杆肽,毒蕈肽与微丝有强亲合作用,使肌动蛋白纤维稳定,抑制解聚,主要包括鬼笔环肽(phalloidin)和类鬼笔环肽(phallacidin)。荧光或者生物素耦联的毒蕈肽可在纳摩尔水平特异性地结合F-actin,基于其水溶性的特点,耦联过的毒蕈肽可以很方便地用来定性和定量标记组织切片,培养细胞及非细胞样品。耦联过的毒蕈肽对不同大小的微丝有相同的亲和

力，均可以 1∶1 进行结合。和其他的肌动蛋白抗体不同，毒蕈肽只与 F-肌动蛋白结合，但是结合特性并不因物种不同而改变，毒蕈肽的非特异性结合基本上可以忽略不计，因此信号和背景的对比度非常高。毒蕈肽通过降低临界浓度(大约 30 倍)促进肌动蛋白单体的聚合，同时毒蕈肽的结合对细胞松弛素、钾离子和温度上升造成的微丝的解聚有抑制作用。因为毒蕈肽非常小，直径为 12～14Å，分子量小于 2 000kDa，因此与耦联过荧光素的毒蕈肽的结合并不影响肌动蛋白与很多其他肌动蛋白结合蛋白的相互作用，包括肌球蛋白、原肌球蛋白和 DNase I 等。更重要的是，结合有毒蕈肽的微丝仍然保持相应的功能：毒蕈肽标记的甘油处理过的肌纤维可以正常收缩，毒蕈肽标记的微丝也可以在固相肌球蛋白底物上移动。Jasplakinolide 是从海绵 Jaspis johnstoni 里分离出来的大环肽，如图 9-2 所示。它在体内对肌动蛋白有很强的聚合作用，可以和毒蕈肽竞争性的结合肌动蛋白结合位点(Kd＝15nM)。Jasplakinolide 有一定的渗透性，因此可以用于活细胞中的肌动蛋白聚合实验研究。Jasplakinolide 所具有的抗真菌、杀虫及抗增值的特性使其在肌动蛋白调节的细胞粘连、细胞迁移、胞吞及囊泡的分选和释放等细胞生命活动研究中起到了重要作用。

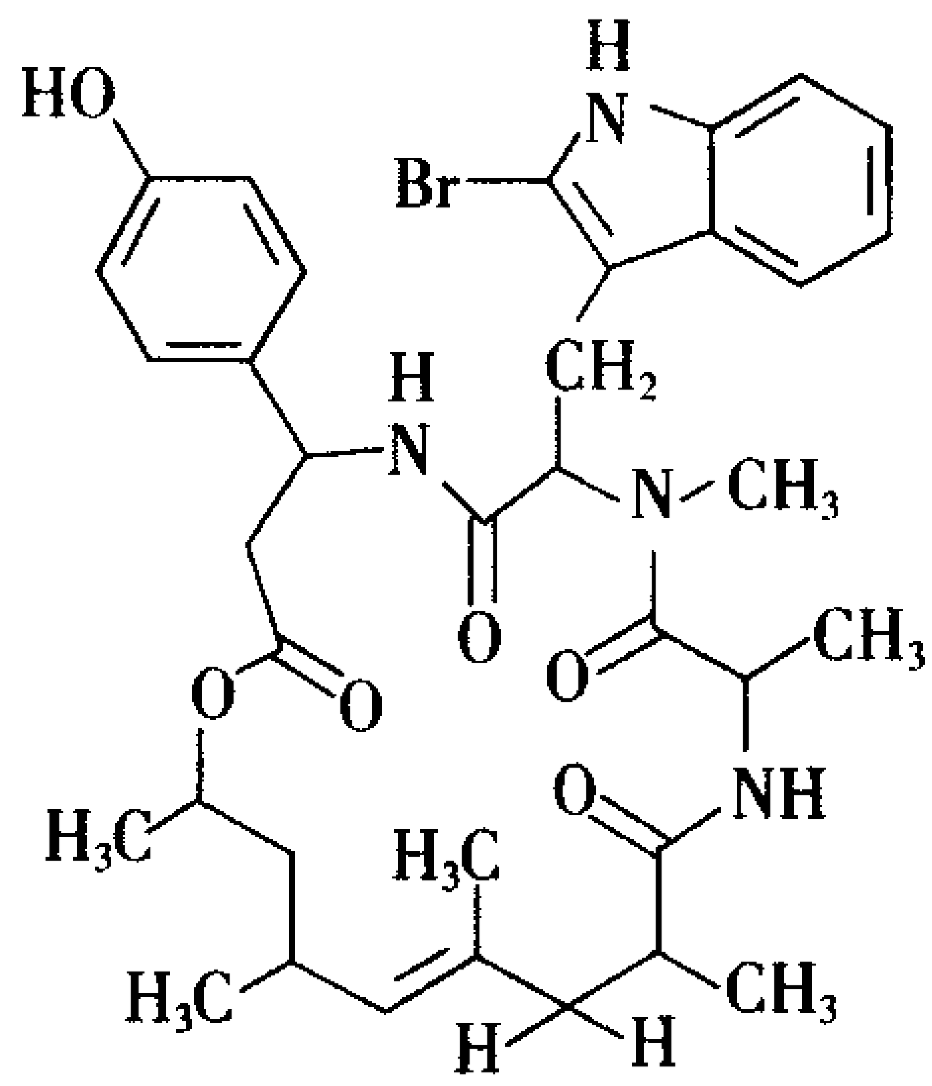


图 9-2　大环肽

常用的耦联毒蕈肽的荧光素有：Alexa Fluor 系列、Oregon Green 系列、BODIPY 系列、FITC、Rhodamine、Texas Red 等。

二、胃壁细胞酸分泌过程中的微丝骨架蛋白研究

实验中，选择胃壁细胞(gastric parietal cell)作为模式系统来研究胃酸分泌过程中的细胞骨架动力学。胃壁细胞的优点在于：极化现象明显，顶膜与底膜分开，同时还可以较容易地得到生物化学研究应用所需的大量细胞。极化上皮细胞具有非常重要的生理功能，如膜蛋白的运输及分泌物外吐。上皮细胞所具有的不对称性与胞质囊泡和质膜的相互作用，以及细胞骨架的结构与调节有关。壁细胞作为一种特化的上皮细胞，具有明显的与其功能活性有关的形态学特征。顶膜是由一系列独特的小管状结构组成，这些小的管状结构从整个细胞的表面及表面突起收缩形成，且具有管间连接。在静息的壁细胞中，这些顶部囊泡表面内衬短而粗的微绒毛，它们主要由肌动蛋白微丝以及结合蛋白支撑着。在整个胞质空间内，含有很多富含 H^+，K^+-ATPase 的膜结构，形态学上它们主要以囊泡、小管以及潴泡形式存在，通常称之为富含 H^+，K^+-ATPase 的管状囊泡。壁细胞一旦被激活分泌胃酸，将发生一系列形态学变化。虽然由于光学显微镜的限制，胃酸分泌的细胞生物学研究进展缓慢，但是 19 世纪晚期 Golgi 的细致组织学观察已经发现处于分泌状态的壁细胞表面管状结构的膨

大。电子显微镜图像也清晰地表明：处于最大程度刺激的壁细胞的管状结构空间扩张，具有伸长的微绒毛的顶膜面积明显扩大，同时胞质管状囊泡数量减少。大量的数据都支持膜循环假设理论。2002 年，科学家们利用高压与快速冷冻技术制备胃壁细胞进行电子显微镜观察并对其三维结构进行分析，更为精确地证实了胃壁细胞活化过程中形态学上的变化。根据高压电镜观察结果所构建的模型清晰地证实了管状囊泡膜从质膜中分离，同时还进一步证实了早期利用化学固定技术进行的研究结果。此外，利用这种新的固定方法发现大量的壁细胞中心体在胞质内形成了一个广泛错综的网络。因为实验已表明胃酸分泌与氧化代谢存在紧密耦联，所以探明中心体动力学与酸分泌是否存在联系以及它们间的联系程度如何将是十分有意义的工作。

根据壁细胞超微结构以及胃壁细胞形态改变的电镜照片和其他很多实验证据，科学家们提出了胃酸分泌过程模型（如图 9-3 所示）：胃壁细胞中有大量的管状囊泡，内含胃酸分泌所需的质子泵（H^+，K^+-ATPase）。当胃壁细胞受刺激后，管状囊泡向顶膜移动，并与顶膜融合，使微绒毛向管腔内急剧伸长，大大增加了顶膜面积，为极大限度地容纳质子泵奠定了基础。同时，原管状囊泡膜上的 H^+，K^+-ATPase 也随之转移到质膜，将 H^+ 运送至胞外。在这个过程中，还可以看到肌动蛋白微丝随着微绒毛的伸长而伸长。当刺激消失后，质膜表面的 H^+，K^+-ATPase 经内吞作用返回到胞质内。胃酸分泌是一个管状囊泡与质膜融合并且循环的过程，涉及膜转运（membrane trafficking）、细胞骨架重排（cytoskeleton remodeling）、内吞（endocytosis）、外

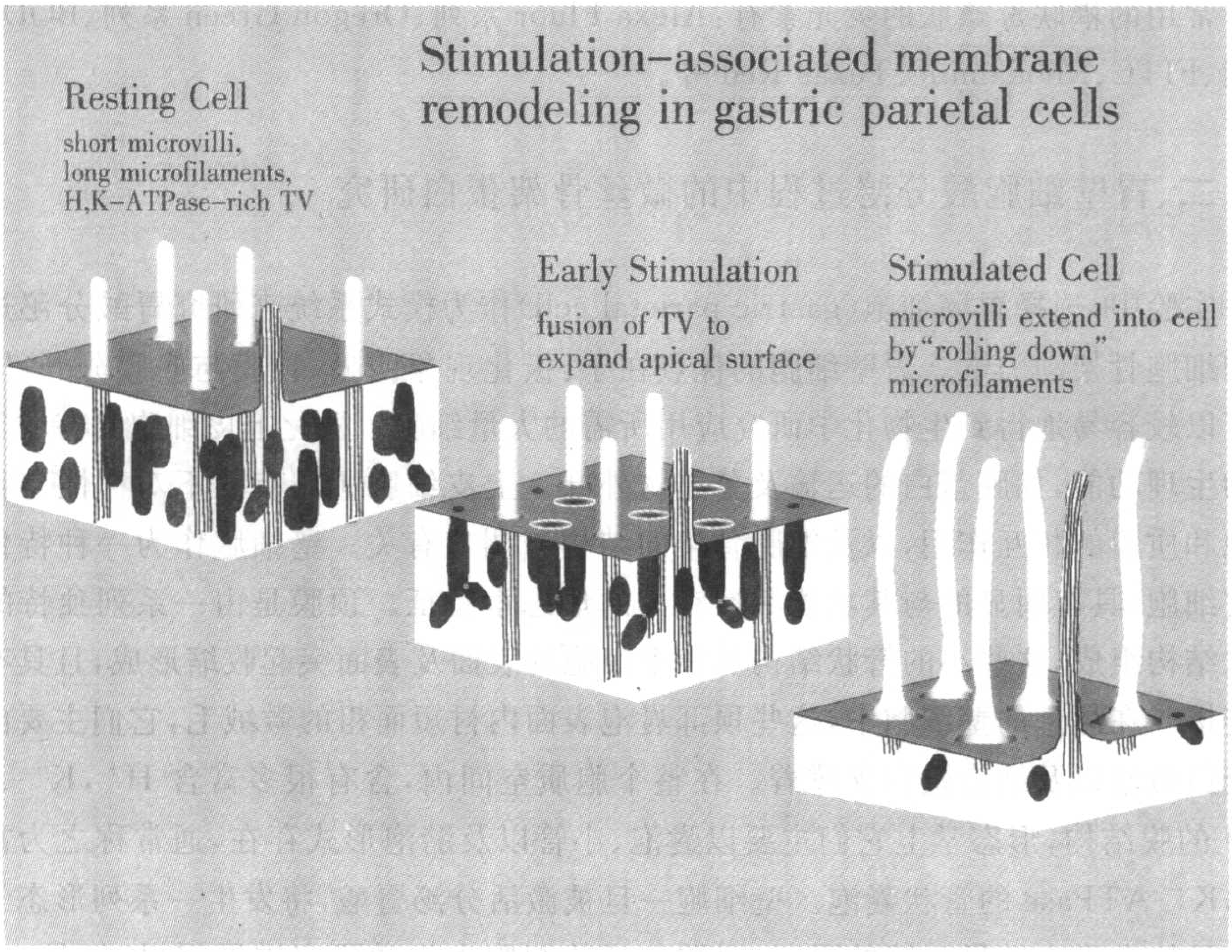


图 9-3 壁细胞酸分泌过程中的顶膜骨架重排示意图

吐(exocytosis),以及信号转导(signal transduction)等过程。

图 9-4 为含 ATPase 的囊泡运输循环示意图,并列出了参与循环的蛋白质处于静息状态的壁细胞中,非活性的胞质管状囊泡(tubulo- vesicles, TVs)中含有质子泵 H^+,K^+-ATPase。促分泌素的刺激引起管状囊泡的转位并最终导致质子泵的活化。一旦刺激减弱,质子泵将内化并终止酸分泌。可调的管状囊泡循环分为下列步骤:

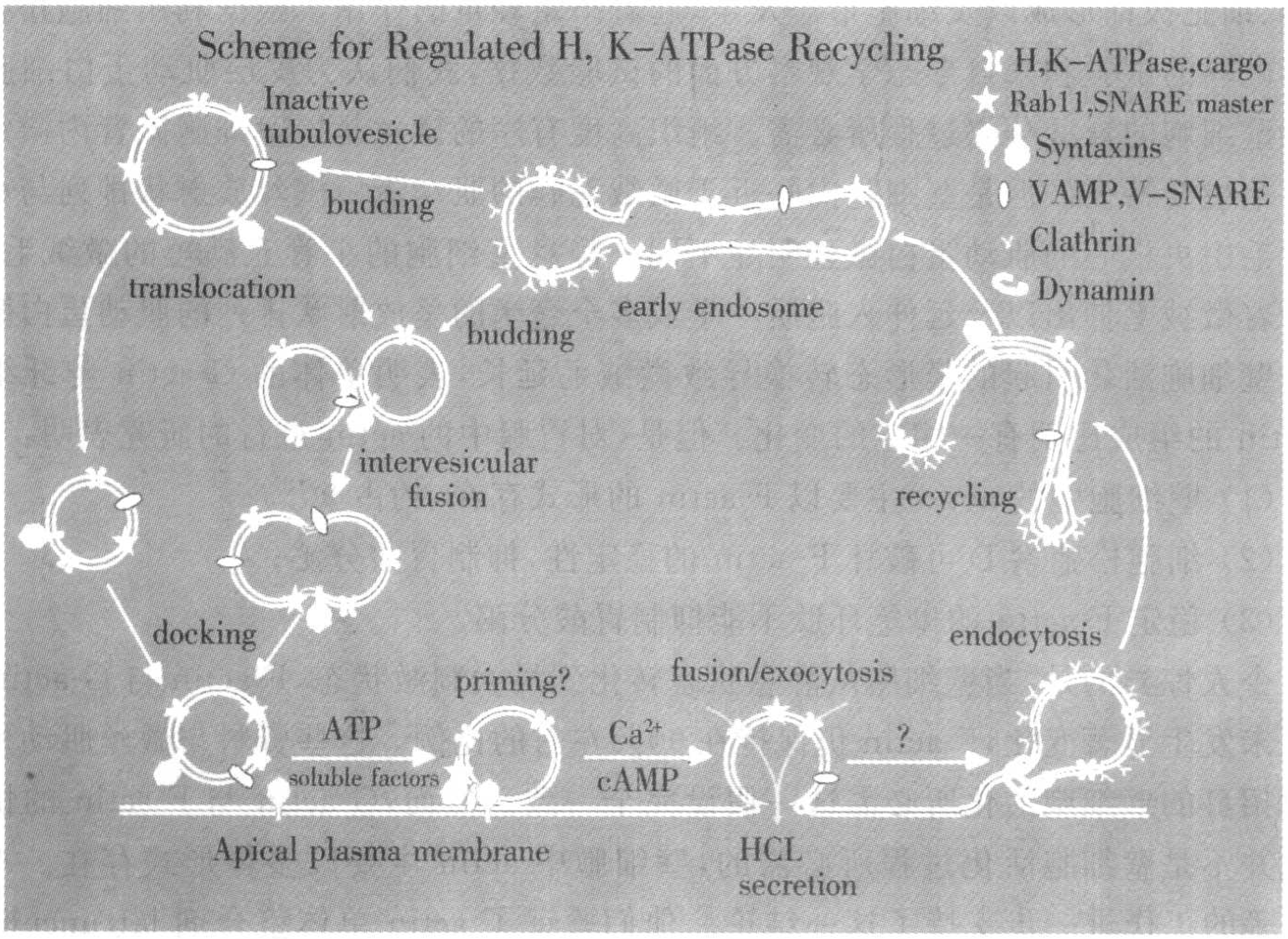


图 9-4　壁细胞中含 H, K- ATPase 的管状囊泡循环示意图

(1) 锚定。含有 H^+,K^+-ATPase 及内因子的管状囊泡锚定在靶向膜的活化区。由于 K^+ 较低的通透性,H^+,K^+-ATPase 失活。锚定可定义为囊泡膜与由特异的蛋白如 VAMP-2,syntaxins,SNAP-25 以及胞吐蛋白复合物 SEC6/8 调节的靶向膜之间的最初联系或相互作用。锚定出现在囊泡与顶膜之间(异型)以及囊泡膜本身之间(同型);

(2) 引发。锚定之后,管状囊泡通过一个成熟过程才能进行膜融合,这一过程可能受依赖于 PKA 磷酸化以及依赖于 Ca^{2+} 的活化的调控;

(3) 融合。引发的管状囊泡的脂类能够与顶膜的脂类混合,从而让 H^+,K^+-ATPase 进入顶膜。质子泵开始将活化的 H^+ 运输出来,而管状囊泡内容物如内因子经过胞吐进入腺腔;

(4) 内吞。刺激除去以后,顶膜富含 H^+,K^+-ATPase 的区域重新回到胞质。最初的内吞通过包被蛋白 clathrin 的凹陷和 dynamin 的推动来实现;

(5) 内体融合。包被的管状囊泡与顶部早期的内体融合。这一过程可能得到了小 GTPase 及其辅助蛋白的推动;

(6) 出芽。管状囊泡主要通过来自循环内体的出芽实现重组。新形成的管状囊泡有的已获得转位及随后的锚定能力，有的还需要进行同型融合来获得这一能力；

(7) 转位。含有 H^+,K^+-ATPase 的管状囊泡要么通过融合要么通过马达蛋白转位返回到活化区。

细胞质膜与细胞骨架的相互作用在许多生理过程中，包括膜受体的移动、内吞、外排、细胞极性形成以及细胞形态发生，起着举足轻重的作用。根据利用细胞松弛素破坏微丝的试验和来自形态学观察方面的试验数据，我们认为皮层肌动蛋白细胞骨架为壁细胞的胃酸分泌过程所必需。组织高度有序的微丝是胃壁细胞微管内微绒毛的一个主要特征。但是壁细胞内临近于微绒毛膜的肌动蛋白微丝放射状排列与小肠微绒毛中央核心的肌动蛋白微丝明显不同。静息壁细胞的小管充满短的微绒毛，包括沿着微绒毛伸出以及延伸入胞质一个或多个毫米的呈放射状排列的肌动蛋白微丝束。壁细胞活化引起的膜形态转换导致微绒毛延长，表明单体的 G-actin 与纤维状 F-actin 的组成比例有一相应的变化。但是，对胃腺中的 actin 进行的研究表明：

(1) 壁细胞中的 actin 主要以 F-actin 的形式存在，约占 90%；

(2) 细胞松弛素 D 可破坏 F-actin 的稳定性，抑制胃酸分泌；

(3) 稳定 F-actin 的鬼笔环肽不能抑制胃酸分泌。

令人惊异的是，当壁细胞从静息状态转化到最大刺激状态，F-actin 与 G-actin 的比值未发生显著变化，F-actin 仍保持在 90%左右的比例。这些资料与微丝肌动蛋白为膜招募的壁细胞活化所必需这一假设完全一致。然而，G-actin 与 F-actin 的快速转化并不是壁细胞活化过程所必需的，壁细胞中 actin 主要以多体形式存在。Ammar 等的工作进一步支持了这一结论。他们验证了 actin 单体螯合剂 latrunculin B (Lat B)对壁细胞结构与功能的影响。Lat B 在只有较高计量($10\sim70\mu M$)时，才能抑制胃酸分泌，增加抽提的单体 actin 的量。因为观察到壁细胞的某些功能对 Lat B 高度敏感，如当 Lat B 的浓度达到 $0.1\mu M$ 时可抑制片状伪足的形成，Ammar 等推断壁细胞内可能存在一个独特的可交换的 actin 池。由于存在一些起稳定作用、加帽作用以及成束作用的蛋白，所以微绒毛微丝相当稳定。据此他们认为 Lat B 抑制酸分泌功能是由于稳定的肌动蛋白微丝减少了肌动蛋白单体接近 Lat B。在兔的胃腺中，肌动蛋白细胞骨架与卡巴可增强 cAMP 介导的酸分泌存在联系。这种增强效应依赖于 3 型(壁细胞内的主要亚型)IP 3 受体调节的胞内储存的 Ca^{2+} 的释放。另一方面，用细胞松弛素 D 破坏肌动蛋白微丝，将优先抑制卡巴可的分泌效应以及与 cAMP 的协同作用。用细胞松弛素 D 处理腺体，也可导致 PI 3 受体的重新分布，这也意味着肌动蛋白微丝与受体介导的 Ca^{2+} 储备间关系的解离。

对肌动蛋白结合蛋白(包括 ERM 蛋白家族和 IQGAP 蛋白家族)在胃酸分泌过程中的作用进行研究所取得的一系列研究结果表明：

1. PKA 调节的 Ezrin 蛋白磷酸化在胃酸分泌过程中起到重要作用

Ezrin 是不同的研究者独立分离出的一个联系细胞骨架与细胞膜的蛋白分子，

其分子量为80kDa。最初，Ezrin是作为酪氨酸激酶受体的底物被分离。其后，该蛋白质从小肠微绒毛的细胞骨架被纯化，并发现在许多不同细胞中。Ezrin存在于富含肌动蛋白的表面结构，据此推断其具有联系细胞膜与细胞骨架的功能。胃壁细胞中Ezrin的最初分离是基于其依赖于PKA的磷酸化，此时的壁细胞处于刺激状态。ERM蛋白家族还包括Radixin以及Moesin。这一蛋白家族是细胞骨架与细胞质膜相互作用的主要调节者，在极化细胞中，它们还是信号传导通路的重要成分。纤维神经瘤Ⅱ(neurofibromatosis Ⅱ，NF Ⅱ)肿瘤抑制基因产物——Merlin，因其在结构与功能上与ERM蛋白家族成员密切相关，故其亦隶属于ERM蛋白家族。

胞质内β及γ-肌动蛋白亚型特异性的抗体的问世为肌动蛋白亚型的原位定位提供了有力工具，以分离的胃腺作为表皮细胞模式系统，Yao等证实：肌动蛋白亚型，特别是胞质中β及γ-肌动蛋白非肌肉亚型在表皮细胞中呈极性分布。β-actin主要定位于所有腺细胞的顶膜，包括壁细胞小管表面富集的卷曲的微绒毛，而γ-actin主要定位于底膜。通过对Ezrin和β-actin的免疫染色，揭示这两个蛋白在胃壁细胞中富集且大部分共定位于壁细胞中的顶膜。ERM蛋白家族成员中只有Ezrin专一地定位于胃壁细胞，且位于壁细胞的顶膜，而β-actin定位于衬于腺腔内层各类细胞的顶膜边界以及胃壁细胞顶膜小管。根据actin-Ezrin的细胞共定位以及α-actin在壁细胞内不表达的事实，Yao等假设Ezrin优先结合于非肌肉β-actin亚型而不结合于骨骼肌α-actin。体外共沉淀试验证实了这一假设，同时还证实Ezrin与β-actin亚型结合的化学定量关系，即1分子Ezrin可结合12个分子β-actin。

体内和体外磷酸化实验的结果表明Ezrin蛋白66位丝氨酸是PKA的底物。

彩图17(见彩页5)为静息期的胃壁细胞，绿色的为Ezrin，红色的为actin。内源性和外源性的Ezrin都主要定位在胃壁细胞的顶膜处；转染了模拟66位丝氨酸被PKA磷酸化的Ezrin突变体(S66D)的胃壁细胞，表现出和刺激期的胃壁细胞类似的扩张了的顶膜空泡，而顶膜面积扩张是壁细胞处于分泌状态的一个重要特征。

彩图18(见彩页5)为刺激期的胃壁细胞，绿色的为Ezrin，红色的为actin。内源性和外源性的Ezrin都主要定位在胃壁细胞的顶膜处；转染了模拟66位丝氨酸不能被PKA磷酸化的Ezrin突变体(S66A)的胃壁细胞，表现出和静息期的胃壁细胞类似的表型，应该扩张的顶膜仍然维持在缩小的状态。

彩图19A(见彩页5)为内源性Ezrin和H^+，K^+-ATPase在胃壁细胞中的定位图，红色的为Ezrin，绿色的为H^+，K^+-ATPase。静息期时H^+，K^+-ATPase弥散在细胞质中，刺激期时H^+，K^+-ATPase重定位到顶膜。

彩图19B(见彩页6)为刺激期的胃壁细胞，红色的为actin，绿色的为H^+，K^+-ATPase。Ezrin S66A突变体抑制了H^+，K^+-ATPase的重定位，H^+，K^+-ATPase仍然弥散在细胞质中；而转染了Ezrin S66D突变体的胃壁细胞中，H^+，K^+-ATPase的定位则没有受到影响。

Urushidani等报道，潜在的酸分泌抑制剂ME 3407可抑制组胺刺激胃壁细胞引

起的形态学变化。因为他们发现 ME 3407 可从顶膜释放磷酸化的 Ezrin,同时抑制组胺引起的 H^+,K^+-ATPase 的转位。据此他们假设 ME 3407 对招募 H^+,K^+-ATPase 所必需的蛋白磷酸化的调节有抑制作用。Ezrin 的去磷酸化与其从顶膜细胞骨架解离出来相关联。为了寻找壁细胞活化过程中钙离子介导的信号传导事件,Yao 等发现胃壁细胞中 Ezrin 与 Calpain Ⅰ相互作用。进一步的研究发现离子霉素介导的胞内钙离子水平提高可激活 Calpain Ⅰ。Calpain Ⅰ调节的蛋白水解可将 Ezrin 从顶膜释放出来,阻止了顶膜中酸分泌的活化,这进一步证实了 Ezrin 具有联系细胞膜与细胞骨架的作用。

2. IQGAP 蛋白在胃壁细胞中的极化定位在胃酸分泌中起到重要作用

IQGAP 是一个小的真核细胞蛋白家族,在酵母、阿米巴及哺乳动物等众多物种中均有分布。在一些微生物如出芽酵母中,哺乳动物 IQGAP 的同源物在其胞质分裂(cytokinesis)的过程中起重要的作用。到目前为止,还未发现哺乳动物 IQGAP 在细胞分裂中起类似的作用,但是在哺乳动物中,IQGAP 在细胞骨架调控、细胞粘连及信号传导网络中均发挥重要的作用。IQGAP 蛋白家族包括 IQGAP 1、IQGAP 2 和最近发现的 IQGAP 3。IQGAP 蛋白作为脚手架蛋白,通过与多种信号及骨架蛋白相结合,参与调控许多细胞生命作用,包括细胞骨架形成、钙粘蛋白调节的细胞粘连、Ca^{2+}/钙调蛋白信号通路、Cdc 42 及 Rac 信号通路、β-Catenin 参与的细胞转录调控等,最近的研究还发现 IQGAP 蛋白在极化上皮细胞分泌中起着重要作用。我们早先的研究发现 IQGAP 蛋白在胃壁细胞中的极化分布现象,其中 IQGAP 2 与 Cdc 42 在顶膜处的相互作用对胃酸分泌的顺利完成很重要。

彩图 20(见彩页 6)为静息期的胃壁细胞,绿色的为 IQGAP 1,红色的为 actin,从左到右是单个胃壁细胞从上到下沿 *Z* 轴的 XY 扫描图片,actin 标记出胃壁细胞的顶膜(细胞里面的囊泡膜)和底膜(细胞膜)骨架。从图片可以看出,在静息期的胃壁细胞中,IQGAP 1 主要定位在胃壁细胞的底膜。

彩图 21(见彩页 6)为刺激期的胃壁细胞,绿色的为 IQGAP 1,红色的为 actin,从左到右是单个胃壁细胞从上到下沿 *Z* 轴的 XY 扫描图片,actin 标记出胃壁细胞的顶膜和底膜骨架。从图片可以看出,在刺激期的胃壁细胞中,IQGAP 1 主要定位在胃壁细胞的底膜。

彩图 22(见彩页 7)为静息期的胃壁细胞,绿色的为 IQGAP 2,红色的为 actin,从左到右是单个胃壁细胞从上到下沿 *Z* 轴的 XY 扫描图片,actin 标记出胃壁细胞的顶膜和底膜骨架。从图片可以看出,在静息期的胃壁细胞中,IQGAP 2 主要定位在胃壁细胞的底膜。

彩图 23(见彩页 7)为刺激期的胃壁细胞,绿色的为 IQGAP 2,红色的为 actin,从左到右是单个胃壁细胞从上到下沿 *Z* 轴的 XY 扫描图片,actin 标记出胃壁细胞的顶膜和底膜骨架。从图片可以看出,在静息期的胃壁细胞中,IQGAP 2 主要定位在胃壁细胞的底膜。

彩图 24(见彩页 7)为刺激期的胃壁细胞,绿色的为 Cdc 42,红色的为 actin,从左到右是单个胃壁细胞从上到下沿 Z 轴的 XY 扫描图片,actin 标记出胃壁细胞的顶膜和底膜骨架。在加入一种人工合成的 Cdc 42 和 IQGAP 2 区域的肽段后,刺激期胃壁细胞的骨架表现出和静息期胃壁细胞类似的结构。

彩图 25(见彩页 7)为刺激期的胃壁细胞,绿色的为 IQGAP 2,红色的为 actin,从左到右是单个胃壁细胞从上到下沿 Z 轴的 XY 扫描图片,actin 标记出胃壁细胞的顶膜和底膜骨架。在加入一种人工合成的 Cdc 42 和 IQGAP 2 区域的肽段后,刺激期胃壁细胞中的 IQGAP 2 弥散在细胞质中,AP-uptake 实验表明加入这种竞争性肽段后,胃酸分泌受到一定程度地抑制。

3. *静息期和刺激期的胃壁细胞中 H^+,K^+-ATPase 的定位*

在静息状态的壁细胞中,顶膜上短的微绒毛被长的微丝所支撑,深深地延伸到胞质内。由于此时膜对 K^+ 的通透性较低,质子泵主要以非活性形式存在于胞质管状囊泡中。一旦分泌激活,将导致同型和异型锚定,以及富含 H^+,K^+-ATPase 的管状囊泡膜和顶膜的融合,从而极大地增加了顶膜的面积,同时使得 H^+,K^+-ATPase 得以到达细胞表面。顶膜和微丝的相互作用(设想是通过肌动蛋白的结合蛋白来实现的)将扩大的表面重组为长的微绒毛。H^+,K^+-ATPase 是 P 型 ATPase,包括催化亚基(α-亚基)以及辅助亚基(β-亚基)。在受刺激情况下,H^+,K^+-ATPase 催化胞内质子与胞外钾离子的交换,因此产生了与胃酸分泌相联系的大量的质子梯度。刺激的失活将导致 H^+,K^+-ATPase 选择性的回收,返回到胞质的管状囊泡中。

彩图 26(见彩页 8)为静息期的胃壁细胞,绿色的为 actin,红色的为 H^+,K^+-ATPase,从左到右是单个胃壁细胞从上到下沿 Z 轴的 XY 扫描图片,actin 标记出胃壁细胞的顶膜(细胞里面的囊泡膜)和底膜(细胞膜)骨架。从图片可以看出,在静息期的胃壁细胞中 H^+,K^+-ATPase 主要弥散在细胞质中。

彩图 27(见彩页 8)为刺激期的胃壁细胞,绿色的为 actin,红色的为 H^+,K^+-ATPase,从左到右是单个胃壁细胞从上到下沿 Z 轴的 XY 扫描图片。从图片可以看出,在刺激期的胃壁细胞中,H^+,K^+-ATPase 定位在顶膜处。

近年来,对壁细胞进行胃酸分泌的细胞生物学研究已取得了巨大进展,已分离出了许多参与胃酸分泌的蛋白,进一步阐明了胃酸分泌的分子机制。目前该领域所面临的挑战是确定参与胃酸分泌的这些蛋白精确的功能及其生理调节作用,进一步完善参与胃酸分泌的蛋白分子相互作用的网络。通过对培养壁细胞表型变化和表达调节蛋白突变体的转基因动物的细胞生物学与生理学研究发现,一旦壁细胞处于激活状态开始分泌胃酸,可以确定某个特定分子是否参与以及如何参与信号传导级联和下游效应物反应。活细胞实时成像、荧光报告分子的细胞分子工程、原子力显微镜等技术的发展将进一步推动胃酸分泌的细胞分子生物学研究。这些研究对我们从生物医学的角度进一步了解消化器官溃疡以及胃癌的成因具有重要意义。

三、材料与方法

(一) 胃壁细胞的原代培养

1. 材料

新西兰白兔，Ketamine，Xylazine，Acepromazine maleate，巴比妥钠，MEM-HEPES(20mM HEPES, pH 7.4)，胶原酶，Matrigel，细胞滤器，PBS(2.25mM K_2HPO_4，6mM Na_2HPO_4，1.75 mM NaH_2PO_4，136mM NaCl，1mM $CaCl_2$，1mM $MgSO_4$)。

2. 方法

(1) 在新西兰白兔皮下注射 100mg/mL Ketamine，20mg/mL Xylazine 和 10mg/mL Acepromazine Maleate，使其镇静；

(2) 耳静脉注射 5mL 20mg/mL 巴比妥钠(致死剂量 25mg/kg)，让其达到手术麻醉状态；

(3) 打开腹腔，找到主动脉(暗红色静脉旁)，远心端用线扎住，近心端打一个结，同时在静脉壁切一小口，插入灌流导管，用注射器推注 37℃ 预热的 PBS 进行高压灌注；

(4) 迅速取下兔胃，用 PBS 清洗 3 次，将胃粘膜从胃平滑肌上刮下来，仔细地切碎，用 PBS 洗 3 次，然后用 MEM-HEPES 洗两次；

(5) 将切碎的胃粘膜在 20mL 含 15mg 胶原酶以及 20mg BSA 的 HEPES-MEM 中消化 30min，37℃，250rpm 离心 5min；

(6) 三倍体积 MEM-HEPES 消化液，静置 30min(沉淀成纤维细胞)；

(7) 过滤消化液(70um cell strainer)，滤下来的即为胃壁细胞；

(8) 1 000rpm 5min，MEM-HEPES 洗 3 次；

(9) 溶液 B 处理 30min，换为溶液 A；

(10) 在盖玻片上铺 3μL 的 Matrigel 帮助细胞贴壁；

(11) 把含有细胞的溶液 A 转入六孔板，37℃培养。

(二) 胃壁细胞的染色

1. 材料

体外培养的胃壁细胞，PBS(pH 7.4)，甲醛(分析纯)，Triton X-100，BSA，耦联有荧光素的鬼笔环肽(Alexa Fluor 488 Phalloidin，from Molecular Probe)，H^+，K^+-ATPase 抗体，Rhodamine(抗兔)，抗淬灭剂。

2. 方法

(1) 用预热的 PBS 润洗细胞两次，每次 5min；

(2) 用 3.7%甲醛(用 PBS 配制)室温固定 7min；

(3) 用 PBS 润洗 3 次，每次 10min；

(4) 用 0.1% Triton X-100(用 PBS 配制)穿孔 4～7min；

(5) 用 PBS 润洗 3 次，每次 10min；

(6) 用 1% BSA(用 PBS 配制)阻断 20min；

(7) 用 PBS 润洗 3 次，每次 10min；

(8) 耦联有萤光素的鬼笔环肽孵育 30min；

(9) 用 PBS 润洗 3 次，每次 10min；

(10) H^+,K^+-ATPase 抗体孵育 60min；

(11) 用 PBS 润洗 3 次，每次 10min；

(12) Rhodamine(抗兔)孵育 30min；

(13) 用 PBS 润洗 3 次，每次 10min；

(14) 加入抗猝灭剂，封片。

3. 注意事项

甲醇对微丝的结构有很大的破坏作用，所用的试剂一定要避免甲醇的污染。

第二节　荧光技术在微管骨架研究中的应用

一、概　　述

微管纤维(microtubule fiber)是细胞内一类极其重要的纤维结构。它是由 13 条原纤维(protofilament)构成的中空管状结构，直径 22～25nm。每一条原纤维由微管蛋白二聚体线性排列而成。微管蛋白二聚体由结构相似的 α 和 β 球蛋白构成，两种亚基均可结合 GTP。α 球蛋白结合的 GTP 从不发生水解或交换，是 α 球蛋白的固有组成部分；β 球蛋白结合的 GTP 可发生水解，结合的 GDP 可交换为 GTP，可见 β 亚基也是一种 G 蛋白。微管具有极性，(＋)极(plus end)生长速度快，(－)极(minus end)生长速度慢，也就是说微管蛋白在(＋)极的添加速度高于(－)极。(＋)极的最外端是 β 球蛋白，(－)极的最外端是 α 球蛋白。由于微管结合蛋白的作用和酶修饰的原因，微管形成的有些结构是比较稳定的，如神经细胞轴突、纤毛和鞭毛中的微管纤维。大多数微管纤维处于动态的组装和去组装状态，这是实现其功能所必需的过程(如纺锤体)。微管在胞质中形成网络结构，作为运输路轨并起支撑作用。

微管组织中心(microtubule organizing center，MTOCs)是微管进行组装的区域，着丝粒、成膜体、中心体、基体均具有微管组织中心的功能。所有微管组织中心都具有 γ 微管球蛋白，这种球蛋白的含量很低，可聚合成环状复合体，像模板一样参与微管蛋白的核化，帮助 α 和 β 球蛋白聚合为微管纤维。

中心体(centrosome)位于细胞的中心部位，如图 9-5 所示。由两个相互垂直的中心粒构成，周围是一些无定形或纤维形、高电子密度的物质，叫做外中心粒物质

(pericentriolar material, PCM)。中心粒直径0.2mm，长0.4mm，由 9 组 3 联微管构成，不直接参与微管蛋白的核化，具有召集 PCM 的作用。

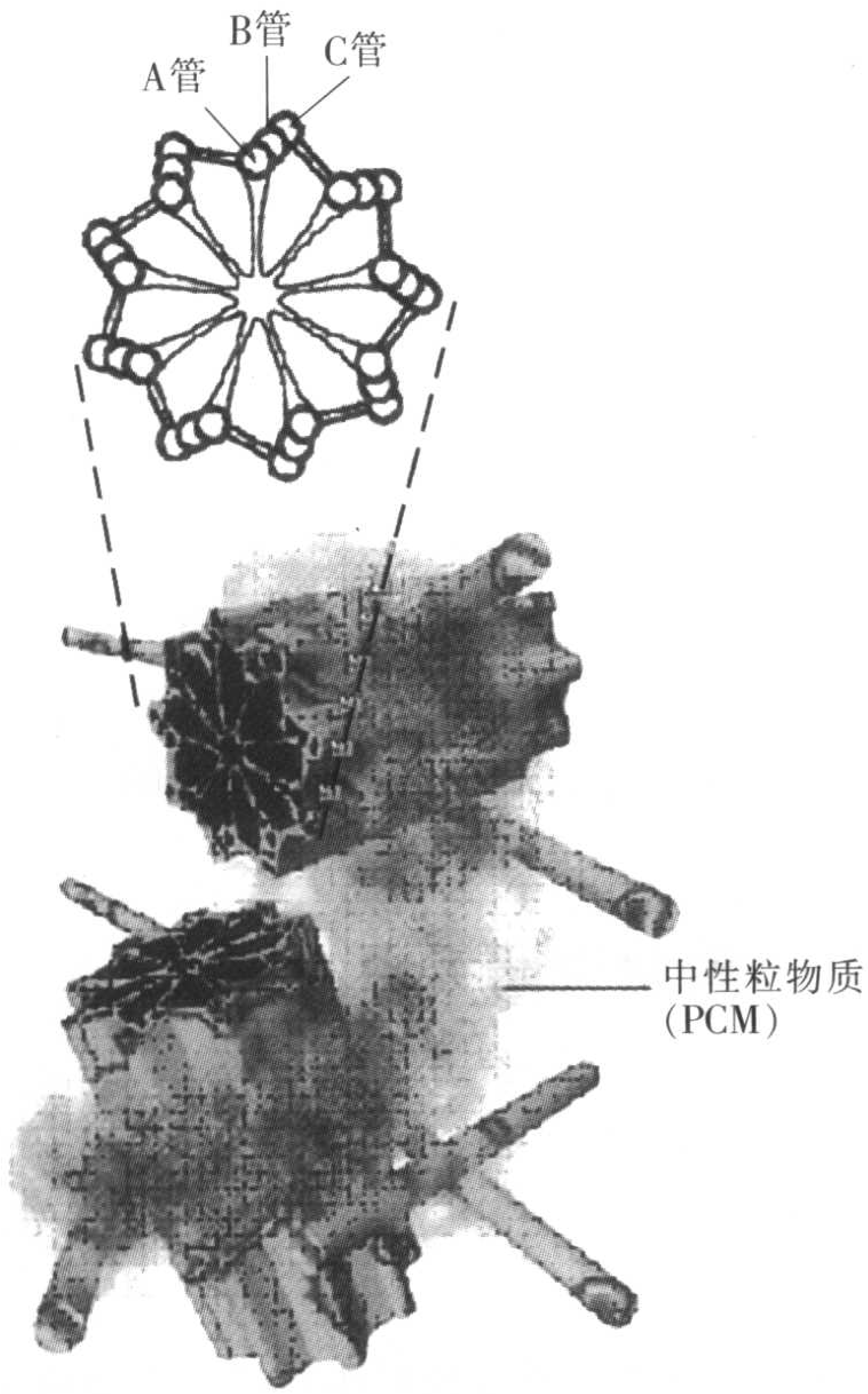


图 9-5　中心体

微管具有极性，微管蛋白以环状的 γ 球蛋白复合体为模板核化，由 α 微管蛋白、β 微管蛋白在 GTP、GDP 介导下动态聚合完成组装。首先组装出(－)极，然后开始生长，因此中心体周围的微管(－)极指向中心体，(＋)级远离中心体。(＋)极(plus end)生长速度快，(－)极(minus end)生长速度慢，也就是说微管蛋白在(＋)极的添加速度高于(－)极。(＋)极的最外端是 β 球蛋白，(－)极的最外端是 α 球蛋白。1972 年 R. Weisenberg 证明，提纯的微管在微酸性环境(pH 6.9)，适宜的温度，存在 GTP、Mg^{2+} 和去除 Ca^{2+} 的条件下，能自发地组装成微管，但这种微管只有 11 条原纤维，可能是因为没有 γ 微管球蛋白构成的模板。微管 β 球蛋白结合的 GTP 水解并不是微管组装所必需的步骤，但是结合 GTP 的微管蛋白二聚体能加合到微管纤维上，在快速生长的纤维两端微管球蛋白结合的 GTP 来不及水解，形成的“帽子”可以使微管纤维较为稳定。一旦暴露出结合 GDP 的亚单位微管，则开始去组装。

微管对低温、高压和秋水仙素敏感。秋水仙素(colchicine)结合的微管蛋白可加合到微管上，但阻止其他微管蛋白单体继续添加，从而破坏纺锤体结构，长春花碱具有类似的功能。紫杉酚(taxol)能促进微管的装配，并使已形成的微管稳定，但这种稳定性会破坏微管的正常功能。以上药物均可以阻止细胞分裂，可用于癌症的治疗。

目前，实验室常用的标记微管的探针除了 Tubulin 的抗体(包括 α、β 和 γ Tubulin)之外，还有太平洋紫杉醇(paclitaxel)、DAPI、Bis-ANS 和 DCVJ (4-dicyanovinyljulolidine)。

太平洋紫杉醇 paclitaxel(如图 9-6 所示)是从太平洋紫杉树树皮中提取出来的植物碱，它可以促进微管聚合，产生的聚合物不受浓度、钙离子、低温和微管解聚药物

的影响。紫杉醇处理过的细胞被阻断在 G_2 和 M 期。

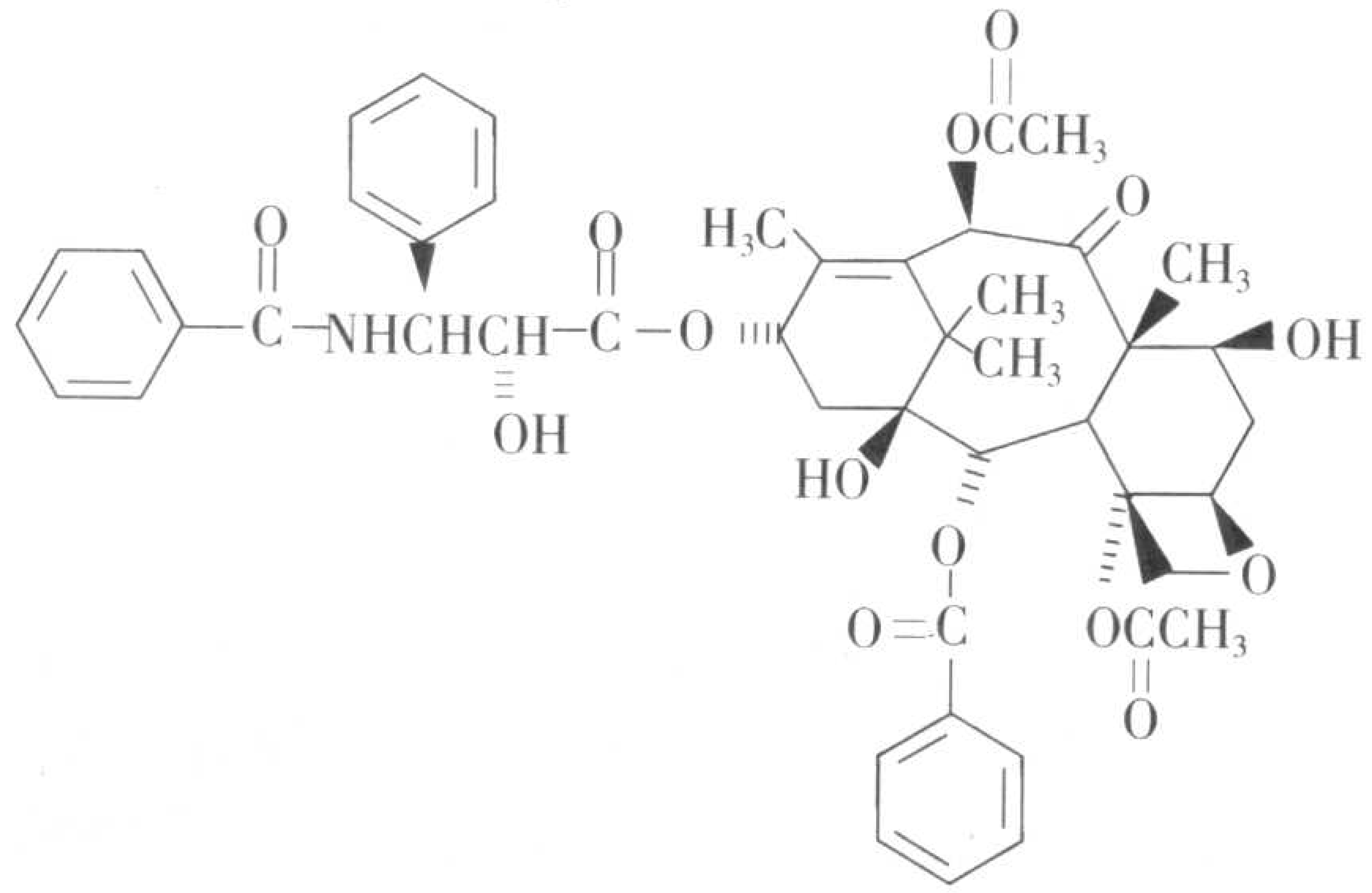


图 9-6　太平洋紫杉醇

二、有丝分裂过程中微管形态与功能的研究

在细胞(有丝)分裂过程中,哺乳动物细胞染色体经历诸多复杂的运动,最终将遗传物质均匀、准确地传递给两个子细胞。整个分裂期的染色体运动过程是通过纺锤体微管与着丝点的协调作用来进行。

微管由 α 微管蛋白,β 微管蛋白在 GTP、GDP 介导下的动态聚合过程来完成组装。该过程与细胞周期的行进紧密联系,特别是有丝分裂期,如图 9-7 所示。

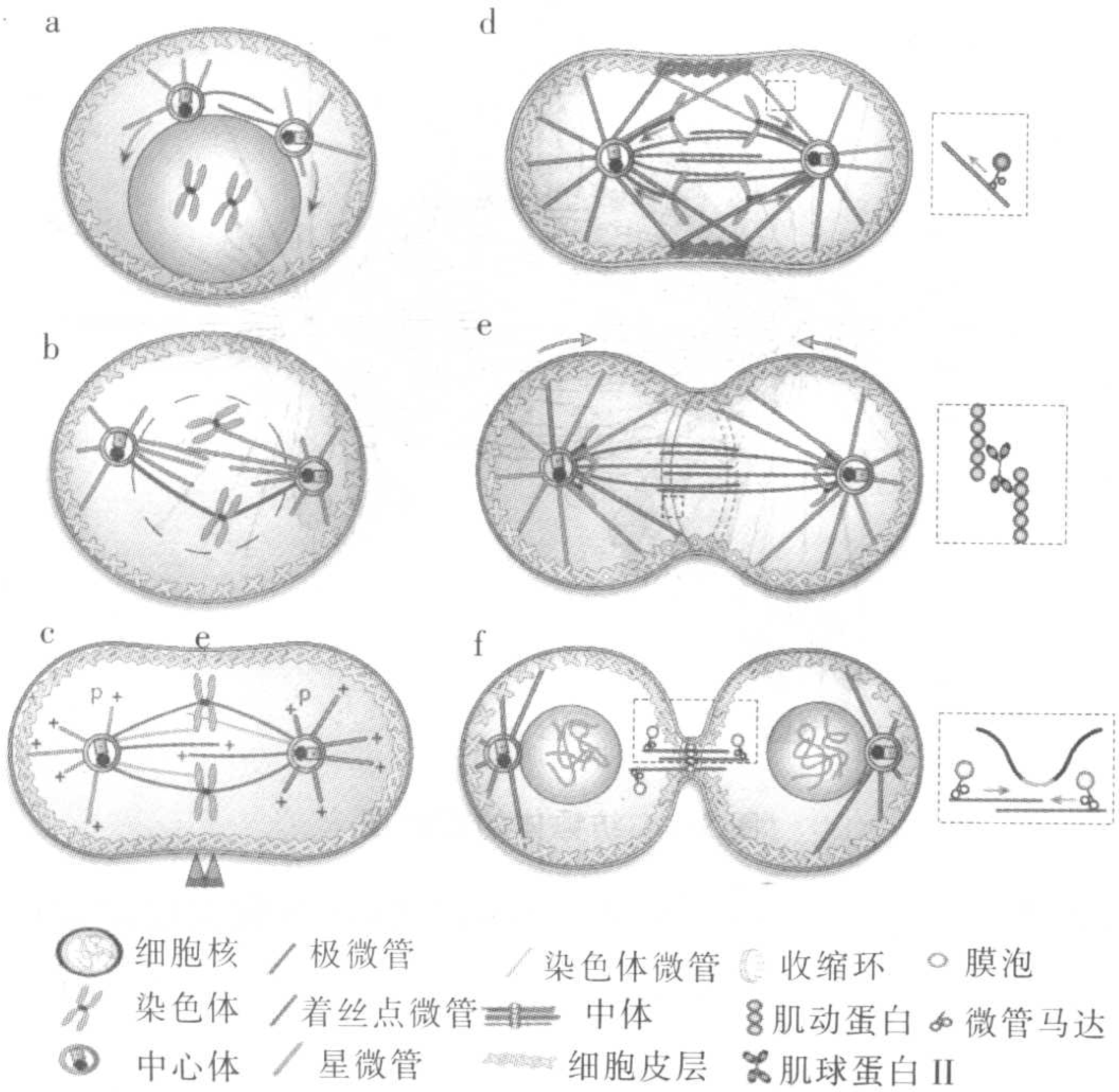


图 9-7　细胞周期示意图

通过对微管的β微管蛋白进行免疫荧光间接标记，我们可以观察到整个细胞周期中微管以及由其组成的有丝分裂期纺锤体形态的变化，如彩图28所示（见彩页8）。在间期，微管多为较细的单根纤丝。一旦进入有丝分裂期，微管的动态性将进一步加强，并涉及到微管的组装、绑捆及相当多的微管结合蛋白的调控。有丝分裂前中期，随着染色体的凝聚，中心体的两极分离，纺锤体开始形成；进入中期，染色体完成赤道板的排列，相应地，纺锤体更呈现极其对称的分布模式；从后期开始，姐妹染色单体在动点微管及星体微管的双重作用下向两极移动，并开始形成这一时期特有的结构——中心纺锤体（central spindle）；随着后期的行进，中间分裂沟（cleavage furrow）的形成及收缩，微管将被高度绑捆，并呈现相当清晰的微管着色。进入有丝分裂末期，伴随着染色体的去解聚和中间收缩环的撤底收缩，中心纺锤体微管将解聚为单体并游离于胞浆中。

细胞中存在的微管调节蛋白众多，功能各异。当前在该领域的研究还在深入，其中有一类负责绑捆的蛋白，由于其表型相当明显，并具有极其重要的有丝分裂期调控功能，因此备受瞩目。彩图29（见彩页9）显示了间期捆绑成束的微管与正常微管的极大差异。

在有丝分裂过程中，微管和中心粒（centrosome）、动点（kinetochore）构成了调节染色体分离的纺锤体。如图9-8所示，微管的负极位于中心粒，由微管组织中心发出，正极向外辐射。根据与正极端相互作用位点的不同，可将微管分为3个类型：

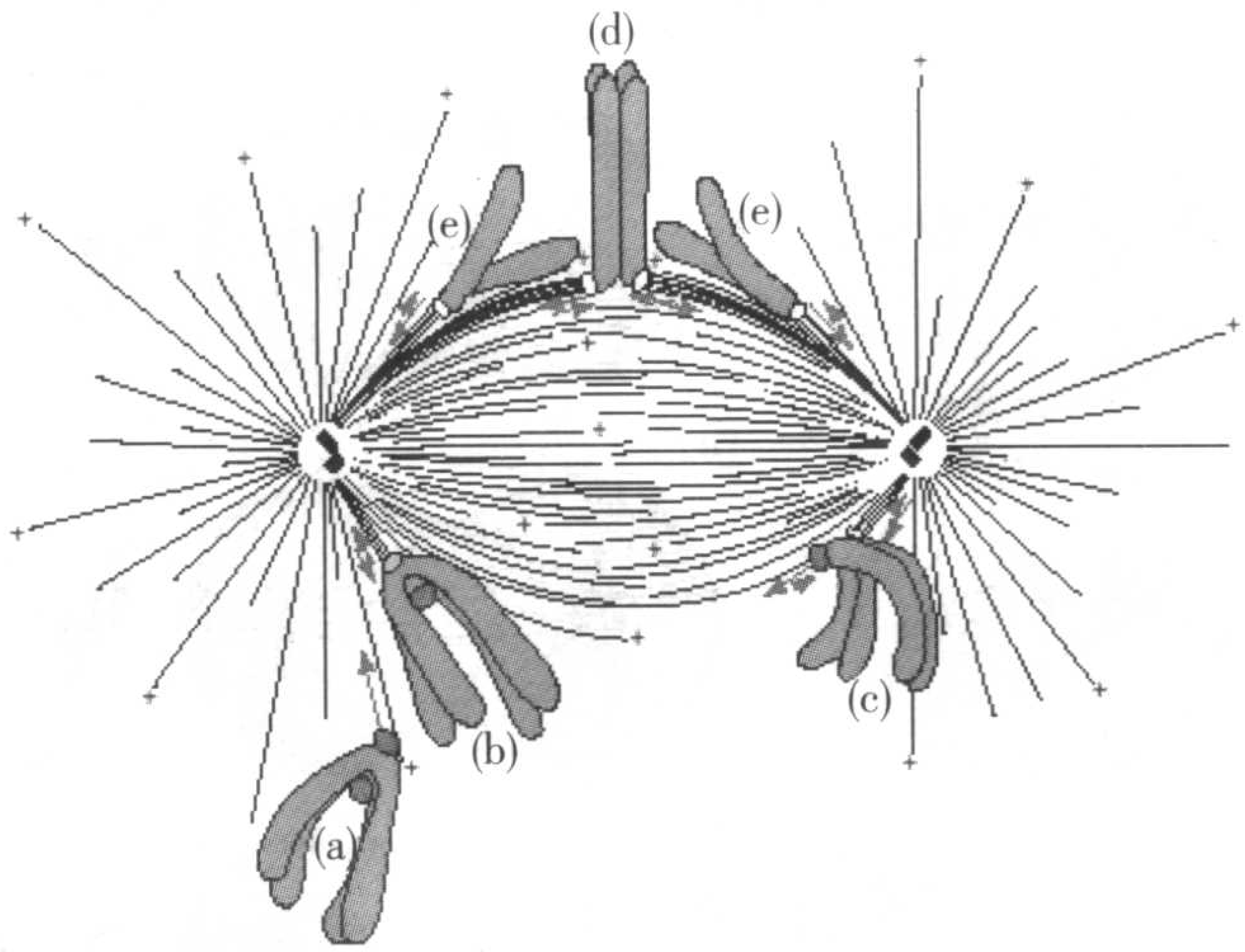


图 9-8　纺锤体的结构图

（1）星体微管，与actin相互作用，参与调节纺锤体在胞内的定位；

（2）极微管，与自另一中心粒发出的微管相互作用，参与染色体的分离和子细胞的形成；

（3）染色体微管，与动点相互作用，参与染色体的排列和纺锤体检验点的校验。

图 9-8 描述了有丝分裂过程中，染色体通过动点与微管的相互作用从前中期(prometaphase)到后期(anaphase)的几个事件：

(a) 有丝分裂初始时，染色体的动点随机与一极中心体的微管相结合，这称为单极定向(mono-oriented)。单极定向的染色体常常向它所附着的那一极中心体运动，称为 P movement；

(b) 随后姐妹动点与另一极的微管相互作用，形成双极定向(bi-oriented)，并且向另一极中心体运动，称为 AP movement。随着两个姐妹动点与两极微管正极末端稳固结合的建立，染色体开始在趋向两极的两个方向间摇摆(oscillation)。最终，染色体移动到赤道板上，该过程称为凝集(congression)；

(c) 凝集后的染色体在赤道板附近摇摆，姐妹染色体逐渐获得相等的微管连接；

(d) 后期，姐妹染色单体分离；

(e) 分离后的染色单体仍然表现出摇摆行为，但总体上是向中心粒方向移动。

和微管形成稳固结合的动点可以有两种运动形式：以恒定的速度或向纺锤体极运动，称为 poleward state；或以恒速背向纺锤体极运动，称为 neutral state。并且可以在两种状态间快速地切换。这些运动能力都与相对稳固的动点微管(K-MTs)的正极端动态性相关。与微管结合的动点以 1.5～2.5μm/min 的运动速率向纺锤体极运动，并且在该方向的运动过程中，被牵拉的染色体动点与着丝粒都较静息状态向外伸长，如图 9-9 中 A 所示。

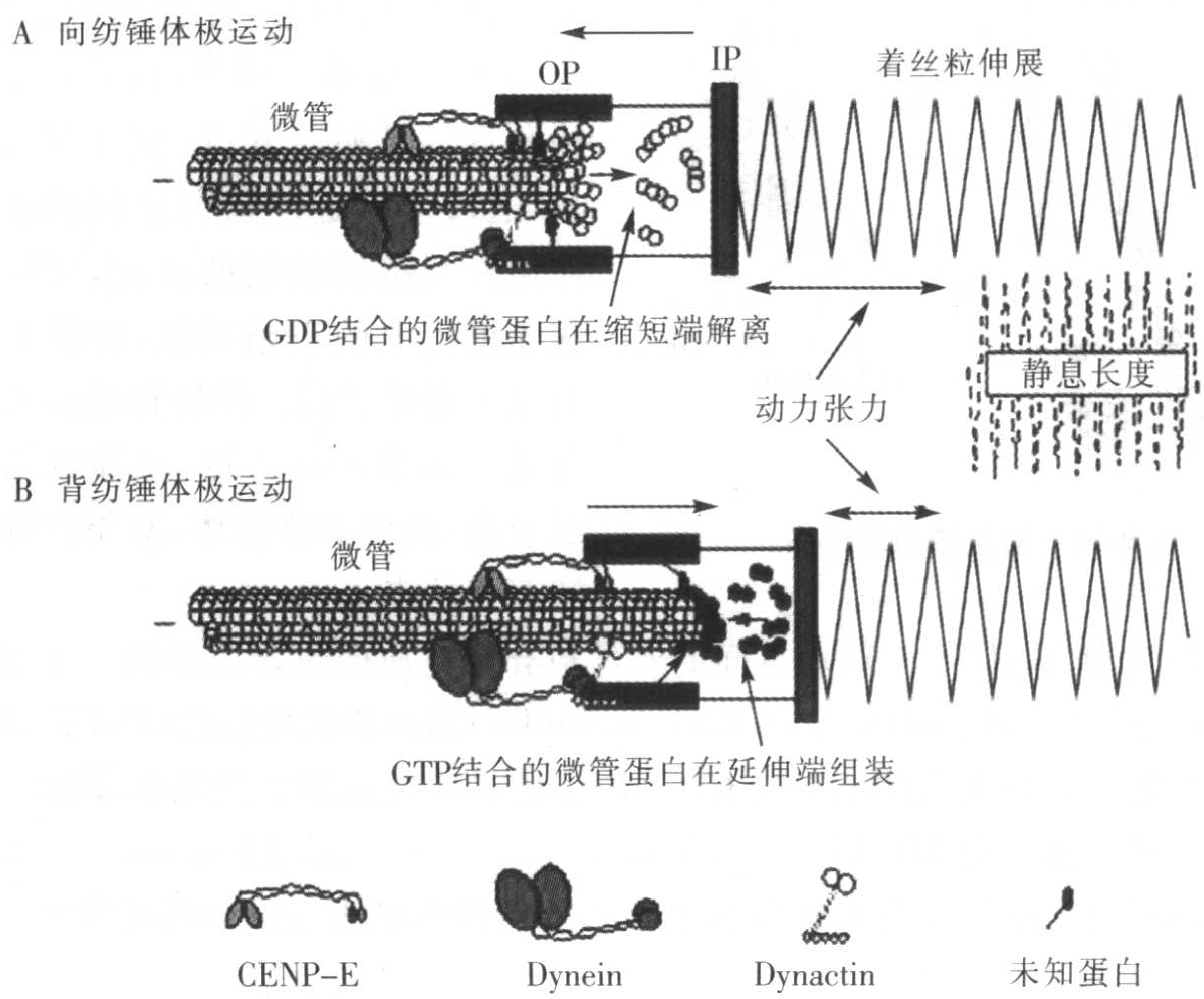


图 9-9　微管组装和去组装模式图

向纺锤体极的运动的力量来源于：

(1) 动点外层结构的冠状纤维上的马达蛋白(例如 dynein)；

(2) 微管正极末端 Tubulin 分子的解聚所释放的晶格能，通过动点上的马达分子的耦联。

当动点上的张力达到临界状态或者导致向极运动的元素耗尽时，动点-微管转入 neutral state，如图 9-9 中 B 所示，此时微管的正极延伸。对于只有一个动点与微管结合的染色体，它的离极运动主要是由延伸的微管施加在动点和染色体臂上的力(ejection forces)；而对于两个动点都与微管结合的染色体，它的离极运动则是由 ejection forces 和姐妹动点的向极运动共同驱动。

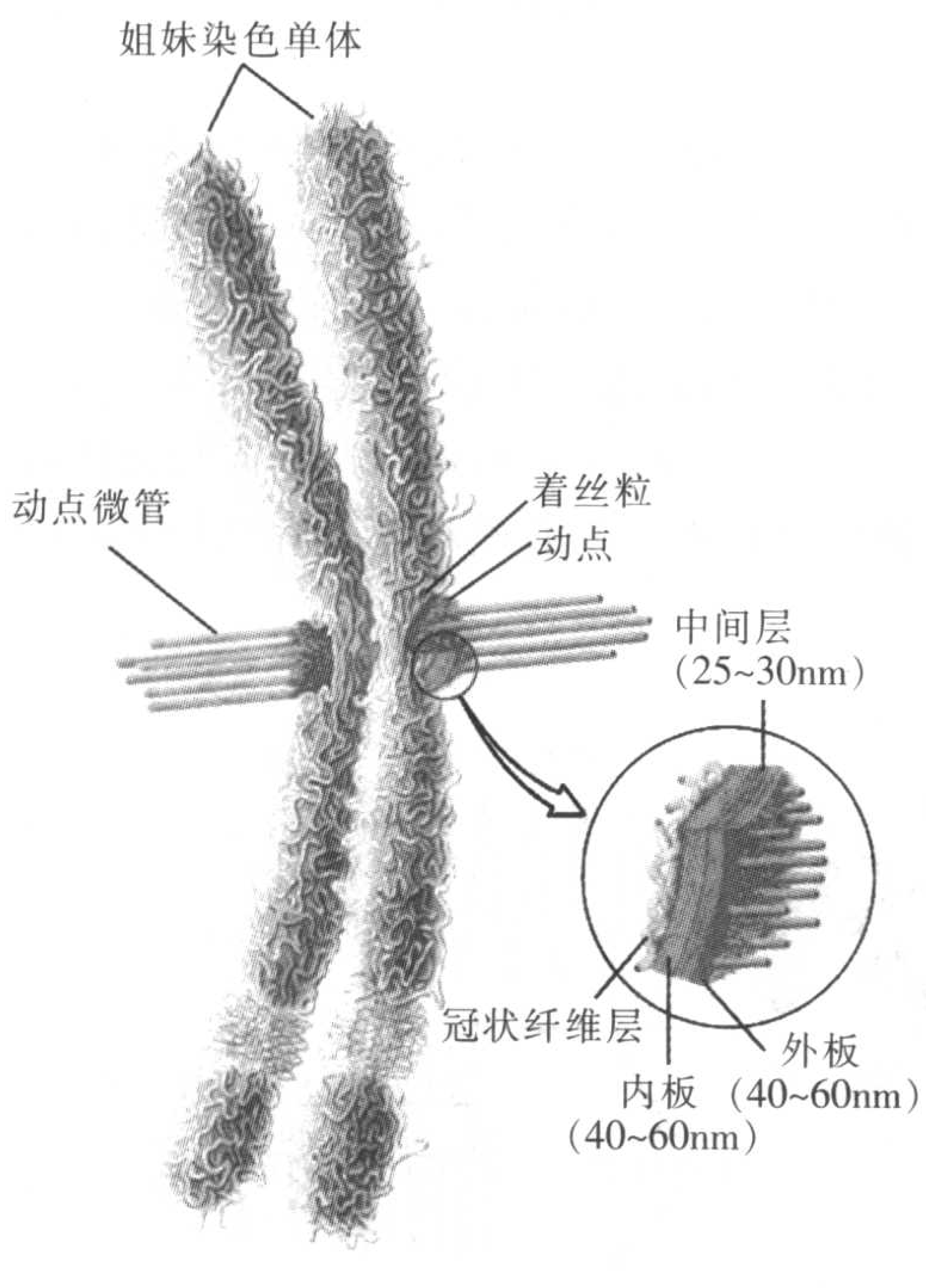


图 9-10　动点结构示意图

微管的动态性通过动点与染色体的运动耦联起来，和诸多的动点上的马达蛋白(如 CENP-E，ZW10，dynein 等)及 spindle checkpoint 中的信号调控蛋白一起指导染色体凝集到赤道板并最终分离到两个子细胞。动点作为连接染色体和着丝点的纽带，由一组结构和功能蛋白在染色体着丝粒区域组装而成，为微管捕获染色体提供物理位点，按结构依次分为内板、中间层、外板和冠状纤维层，如图 9-10 所示。同时，动点也是纺锤体检验点信号通路开启、整合与级联的平台，通过动点定位蛋白之间的动态相互作用以及激酶的辅助调控，实现染色体在赤道板上的正确列队，确保有丝分裂有条不紊地进行。纺锤体检验点信号通路任一环节一旦失控，将导致染色体错误分离，出现非整倍体，甚至伴随着凋亡和癌症的产生。

如图 9-11 所示，位于一对动点间的着丝粒异染色质区包含大量的 α-卫星 DNA、centromere associated protein B (CENP-B，80kDa)和内着丝粒蛋白(INCENP)，这些蛋白可能与维系姐妹染色体的粘连有关，并且是支持动点组装的结构基础。还有研究表明该区域可能含有 MCAK(mitotic centromere associated kinesin)。MCAK 的非洲爪蟾同源物 XKCM1 在爪蟾卵提取物中是纺锤体形成与维持所必需的。免疫电镜研究结果表明，动点结构可分为 4 层：内板、中间层、外板和冠状纤维层。内板紧贴着上述的异染色质区，含有 CENP-C(140kDa)、CENP-G、CENP-H 和 CENP-I，是维持动点功能所必需的。中层含有多个磷酸化的蛋白，这些蛋白的磷酸化位点可被单

抗 3F3/2 所识别,它们被认为是中期/后期转位的调控蛋白——通过感受张力的变化来实现纺锤体检验点的调控,此外 MCAK 亦有可能位于该层。动点的外层是与微管正端结合的部位,该层含有 CENP-F/mitosin(350kDa)、CENP-E 和 ZW10,还可能含有胞质动力蛋白 dynein 及其相关的动力蛋白激活蛋白复合物 Dynactin。从外板向外延伸的冠状纤维层(纺锤体微管结合点)则含有 CENP-E、ZW10 和 Dynein。冠状纤维层还含有 Mad(mitotic arrest defect)家族蛋白和 Bub(budding uninhibited by benzimidazole)家族蛋白,它们被认为在纺锤体检验点中起重要作用。

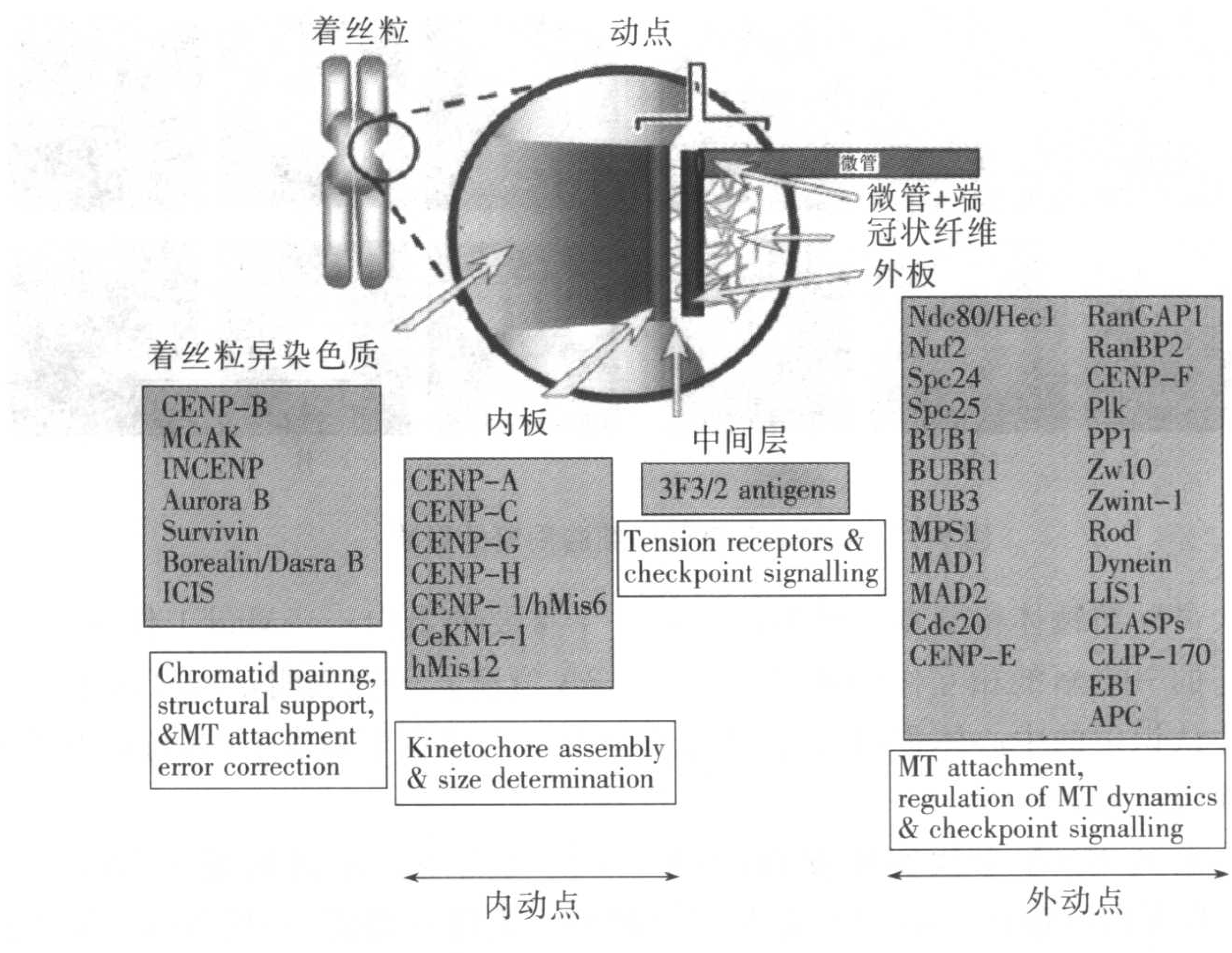


图 9-11 动点蛋白分类图

根据动点蛋白与动点结合的时相关系可将其分为两类:

(1) 在整个细胞周期过程中自始至终都与动点结合的动点蛋白;

(2) 只是在有丝分裂过程中暂时性地与动点结合。

前者包括 CENP-A、CENP-B、CENP-C、CENP-G 以及最近发现的CENP-H和CENP-I。这些蛋白主要是起构建与维系着丝粒-动点复合物结构的功能。后者包括CENP-E、CENP-F、MCAK、Mps1、Aurora B、INCENP、Survivin、Mad 家族和 Bub 家族,它们在姐妹染色体的分离和纺锤体检验点的信号通路中起重要作用。依赖于细胞周期的动点蛋白是按一定的时间、空间顺序组装到动点上的。

现已知的动点蛋白 Mad1、2、3,Bub1、2、3 及 CENP 蛋白家族都参与监控染色体的正确分离及传代。这种调控过程称为纺锤体调控点。它们的功能异常将导致染色体不稳定性。众所周知,染色体不稳定性是导致癌症发生的主要过程。我们的最新

研究发现动点马达蛋白 CENP-E 不仅是稳固连接微管和纺锤体的必要成分，而且参与纺锤体调控点信号传导。我们将在已知研究的基础上，重点研究染色体不稳定性以及纺锤体调控点所涉及的生化通路及调控，为揭示纺锤体调控点失调如何导致染色体不稳定性癌变的分子机理奠定基础。我们早期的研究结果表明马达蛋白 CENP-E 的敲除不会影响纺锤体的组装，但会导致染色体的错误排列（如图 9-12 中 A、B 所示），彩图 30（见彩页 9）为三维去卷积处理过的免疫荧光图像，绿色标记的是微管，蓝色标记的是染色体，红色标记的是动点。

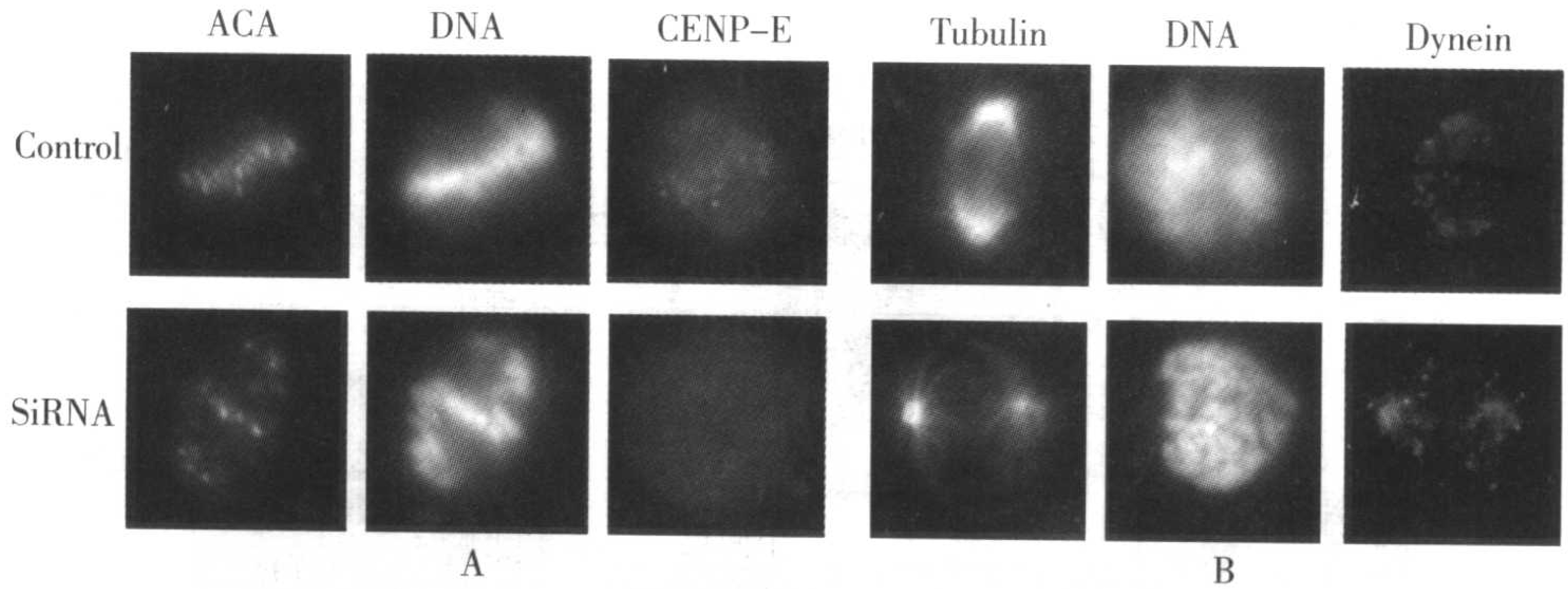


图 9-12 CENP-E 敲除对细胞周期的影响

研究人员用纺锤体检验点信号通路中的一个重要的蛋白——Mad 1 作为诱饵，筛选到了它的一个新的相互作用蛋白——Nek 2A 激酶。研究表明，Nek 2A 不仅仅局限于以往认识中的中心体蛋白，它在细胞有丝分裂期定位于动点上，参与动点组装和纺锤体检验点调控。

通过一系列 RNA 干扰实验发现，Nek 2A 的动点定位单向依赖于 Hec 1 和 Mad 1等上游蛋白的存在，Nek 2A 为 Mad 2 的动点定位所必需，一旦 Nek 2A 功能异常，将会导致染色体提前分离，姐妹染色单体之间形成染色体桥（如彩图 31 所示，见彩页 9）。我们认为，Nek 2A 通过影响 Mad 2 等相关动点定位蛋白的功能从而在纺锤体检验点通路中发挥作用，而 Nek 2A 的激酶活性在动点组装中的作用更是一个悬而未决而又值得深究的课题。

动点中存在许多物种进化高度保守的蛋白复合物，维持其在动点组装和纺锤体检验点信号通路中结构和功能的保守性和专一性，复合物往往任一组分都缺一不可，并在物种进化的驱使下衍生出新的结构组分作为功能补充。其中人源 Ndc80 复合体（Hec1，Nuf2，Spc24，Spc25）位于动点的内板与外板的交接处，对于早期动点结构基础上的内层与外层的结构和功能衔接起到十分关键的作用，为微管对动点的正确捕获提供的重要保障。

中体（midbody）形成于有丝分裂后期，并介导一系列重要的胞质分裂事件，以确保有丝分裂最后阶段的顺利完成。为了揭示中体所参与的胞质分裂的分子调控机制，我们通过搜集同步化的后期细胞结合差速及密度梯度离心，成功分离中体，并利

用蛋白质组学技术鉴定中体的组成（如彩图 32 所示，见彩页 9）。通过免疫荧光标记结合小核苷酸干扰（SiRNA）技术，我们初步揭示了参与胞质分裂调控的重要蛋白 PRC 1和 MKLP 2 的功能。

细胞有丝分裂进程中的关键事件如中心体分离（centrosome separation）、双极纺锤体组装（bipolar spindle assembly）、染色体分离（chromosome segregation）和胞质分裂（cytokinesis）都需要精密调控。若存在差错，就会导致产生多倍体、非整倍性或染色体缺失，从而可能产生癌症。在图 9-13 中，这些事件的调节都与蛋白质的磷酸化与去磷酸化有关。如图 9-13 所示，目前已知有几类激酶在有丝分裂进程中起调

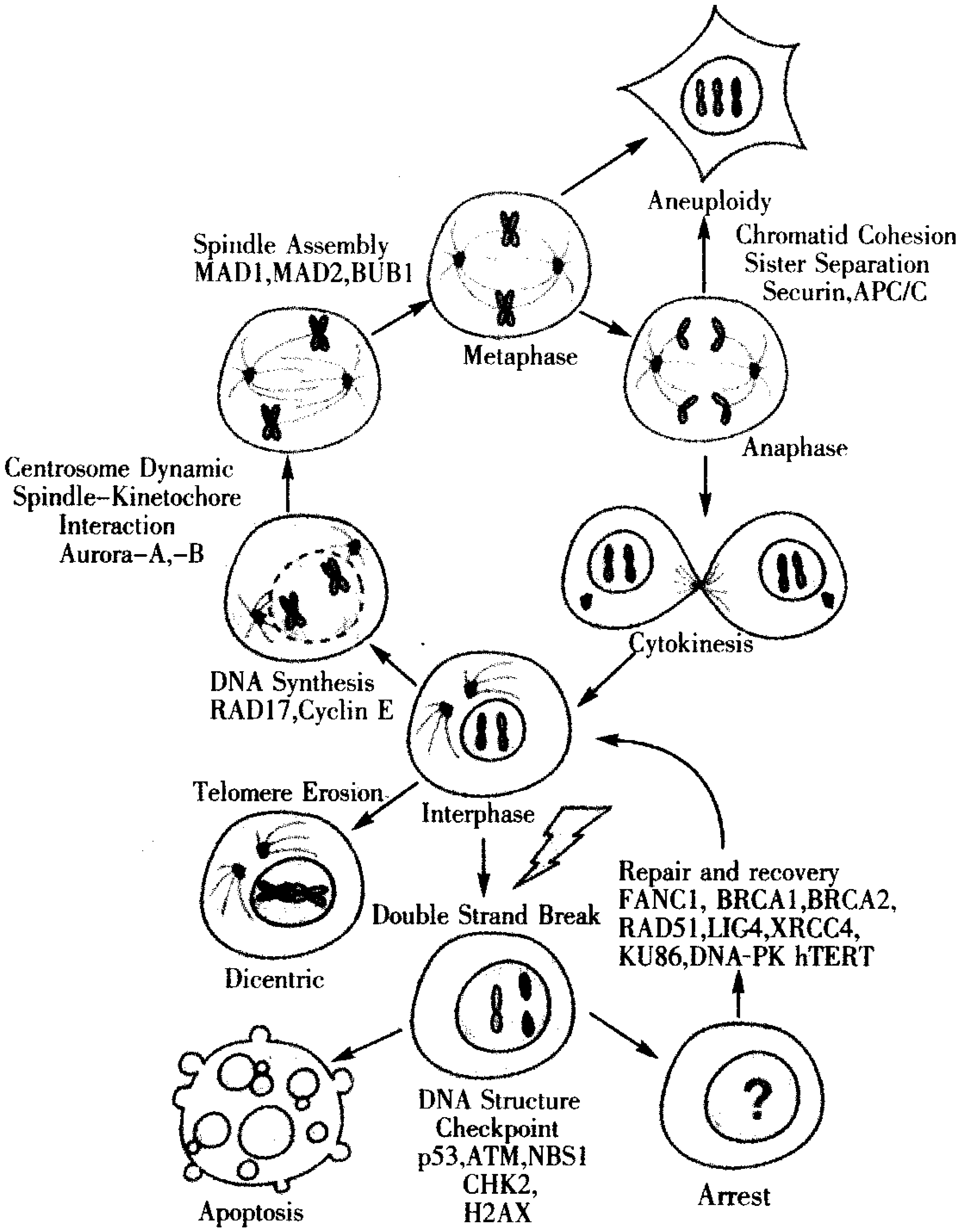


图 9-13 细胞有丝分裂过程

控作用。细胞周期素依赖的蛋白激酶家族（CDK）参与调节 DNA 复制和有丝分裂相关的众多分子事件；PLK 激酶家族（polo-like kinase）和 NEK 激酶家族（NIMA-related kinase）则主要调节中心体增殖和成熟。涉及纺锤体检验点组装和调控的激酶包括 hMps 1/TTK，Bub 1，BubR 1，Aurora B。Plk 1 和 MAPK 可能也参与此功能。

Nek 2、TTK 是酵母的 MPS 1 激酶在人类中的同源物，MPS 1 激酶是一个进化中保守的蛋白质激酶家族，对于中心体的复制和纺锤体检查点信号转导都发挥重要作用。

TTK 激酶是一个参与调节中心体复制，纺锤体微管稳定性，动点纺锤体检查点组装和检查点信号转导等多个事件的多功能蛋白质。我们在进行动点蛋白质组学的研究过程中，通过亲和层析和质谱分析相结合发现，TTK 与动点马达蛋白 CENP-E 形成复合物。进一步的免疫荧光研究表明，TTK 和 ACA(CREST 抗体)定位于动点的不同区域，而与 CENP-E 共定位于动点的最外层(如彩图 33 所示，见彩页 10)。通过对 TTK 激酶突变体的分析，提示 TTK 激酶活性对有丝分裂的进程是必要的。当 TTK 激酶失活突变体表达时，TTK 下游蛋白 TACC 2 的磷酸化迁移条带显著减少。免疫荧光研究证实，TTK 与 TACC 2 在 M 期时在中心体上共定位。这些结果提示，TTK 可能与 TACC 2 在 M 期的中心体上相互作用并且导致 TACC 2 蛋白的磷酸化。

彩图 34(见彩页 10)表明 TTK 定位于动点。其中，彩图 34 中(a)为 ACA 抗体标记 Hela 细胞的动点；(b)为 DAPI 标记的染色体 DNA；(c)为 TTK 抗血清标记 TTK 的定位；(d)为三色荧光的合并图，红色为 TTK，绿色为 ACA，蓝色为 DNA。从图中可以看出，TTK 定位于动点(ACA 染色)外层。

对 TTK 的亚细胞定位进行免疫电镜分析，结果表明，TTK 在间期定位于中心体和核孔复合物，在前中期定位在中心体和动点。一旦染色体实现了双级定向后，TTK 离开排列在赤道板上的染色体动点并向纺锤体极运动。在有丝分裂期 Hela 细胞中，TTK 定位于正在组装中的动点和纺锤体极上。TACC 2 是 TTK 的下游蛋白，当 TTK 激酶失活突变体表达时，TACC 2 蛋白的磷酸化迁移条带显著减少。免疫荧光研究证实 TTK 与 TACC 2 在 M 期时在中心体上共定位。这些结果提示 TTK 可能与 TACC 2 在 M 期的中心体上相互作用并且导致 TACC 2 蛋白的磷酸化。我们的研究首次表明，TTK 激酶是一个联系动点纺锤体检查点和中心体动力学的桥梁。

细胞周期是细胞复制的过程，在此过程中细胞生长并且发育为一个完整的生命体。细胞周期中最为重要的事件是那些涉及遗传物质的复制和分配的事件，也就是在间期复制染色质 DNA 并且在有丝分裂期分离复制的染色体。每个事件的开始都受到精确的调控，并且事件执行过程中的错误可以被修正。在从最简单的单细胞真核生物酵母直到复杂的后生生物例如人类自己，这些调控的分子事件都是高度保守的。细胞周期事件的精确调控可以保证生命的存活，而这些精确调控的丢失则会增加染色体不稳定性并且增加罹患癌症的风险。在合子形成过程中，有丝分裂细胞周期被改变为减数分裂细胞周期，产生对有性生殖至关重要的染色体数目减倍。减数分裂同时增加了遗传变异，而变异是进化的驱动力。因此，细胞周期在所有生命的调控和发育过程中发挥中心作用，而且保证生命在亲代和子代的连续性。在真核生物中，保证有丝分裂过程中精确的染色体分离的分子机制对于保证染色体的整倍性是

极其重要的。精确的染色体分离不仅需要染色体 DNA 上的功能结构域,也需要细胞周期过程中众多分子的协调。定位于着丝粒 DNA 上的动点复合物和其调节系统对于染色体分离的保真性是必需的。对动点复合物结构、组装和功能的进一步研究将帮助我们更透彻地了解细胞增殖调控蛋白质网络。

三、观察 Hela 细胞中微管和 ACA 蛋白的定位

1. 材料

Hela 细胞、PBS(pH 7.4)、PHEM、甲醛(分析纯)、Triton X-100、BSA、β-Tubulin 抗体、ACA 抗体、FITC、Rhodamine、抗淬灭剂。

2. 方法

(1) 用预热的 PHEM 润洗细胞,室温 1min;
(2) 用预热的 0.1% Triton X-100(用 PHEM 配制)抽提细胞,室温 1min;
(3) 用 3.7%甲醛(用 PHEM 配制)室温固定 7min;
(4) 用 PBS 润洗 3 次,每次 10min;
(5) 用 1% BSA(用 PBS 配制)阻断 20min;
(6) 用 PBS 润洗 3 次,每次 10min;
(7) β-Tubulin 抗体孵育 30min;
(8) 用 PBS 润洗 3 次,每次 10min;
(9) FITC(抗兔)抗体孵育 60min;
(10) 用 PBS 润洗 3 次,每次 10min;
(11) ACA 抗体孵育 60min;
(12) 用 PBS 润洗 3 次,每次 10min;
(13) Rhodamine(抗兔)孵育 30min;
(14) 用 PBS 润洗 3 次,每次 10min;
(15) 加入抗淬灭剂,封片。

3. 结果

彩图 35(见彩页 10)为有丝分裂期的细胞,蓝色标记的为染色体,红色标记的为微管,绿色标记的为 ACA。

4. 注意事项

微管的结构对温度和钙离子比较敏感,所用的试剂一定要预热,同时避免钙离子的污染。

第十章　荧光原位杂交

对于染色体的研究始于19世纪70年代，但直到1956年，才最终确定人类体细胞具有46条染色体。随后，染色体标本制备和染色技术也得到快速发展，尤其是空气干燥法制备染色体标本和染色体显带技术的发明，使人们把肿瘤和先天生理缺陷与染色体异常联系起来，从而奠定了现代细胞遗传学的基础。20世纪70年代，人们用放射性同位素标记DNA片段，并与中期染色体标本杂交，建立了染色体放射性原位杂交技术(in situ hybridization，ISH)。放射性原位杂交技术使我们能够把DNA片段定位在染色体上，从而开创了用分子生物学方法研究细胞遗传学的先河，催生了分子细胞遗传学。但由于放射性原位杂交操作繁复、实验周期长、不安全等，人们开始尝试用非放射性物质取代同位素来标记探针，如用生物素和地高辛标记探针，于是建立了非放射性原位杂交技术。1986年Pinkel等用耦联FITC的avidin (fluorescein-labeled avidin) 检测生物素标记的DNA探针，并在荧光显微镜下进行分析，从而建立了荧光原位杂交技术(flourescence in situ hybridization，FISH)。FISH技术由于灵敏度高、实验周期短、操作安全，特别是可以同时分析一种以上的探针，因此很快成为检测染色体异常的重要手段。同时，FISH技术本身也得到快速发展。

第一节　荧光原位杂交的基本原理与基本过程

一、荧光原位杂交的基本原理

荧光原位杂交如彩图36所示(见彩页11)，用荧光色素标记的核酸作为探针，按照碱基互补的原则，与待检材料中的核酸进行特异性结合，形成可被检测的杂交双链核酸。或者把耦联有报告分子(reporter molecule)的核酸作为探针，在杂交后，用带有荧光标记的报告分子的亲和物或抗体进行检测。由于DNA分子在染色体上呈线性排列，因此可以用基因或基因片段作为探针与染色体标本进行荧光原位杂交从而将基因定位在染色体上。

二、荧光原位杂交的基本实验过程

荧光原位杂交的基本实验过程如图10-1所示，主要包括探针制备、杂交标本的

制备、杂交前预处理、杂交、杂交后处理和杂交标本分析，现分别介绍如下：

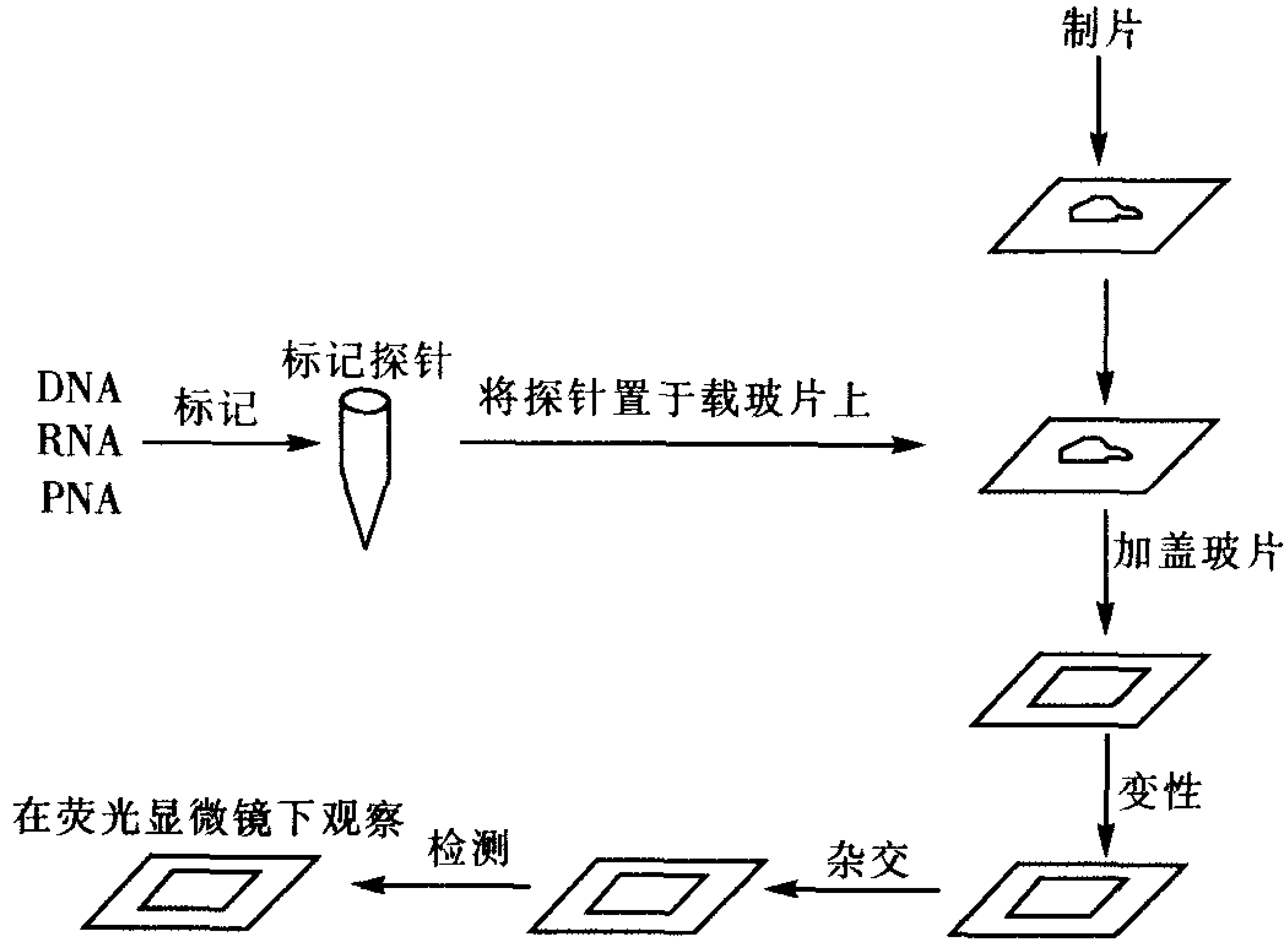


图 10-1　荧光原位杂交(FISH)的基本实验过程

（一）探针制备

进行荧光原位杂交首先需要有杂交探针。探针是一段带有荧光色素或(半)抗原的核酸序列。其长度介于 15 至数千个核苷酸之间，但以 250～650 个核苷酸的探针杂交效果最好。探针可以是完整的基因，也可以是基因片段；可以是天然的，也可以是人工合成的核酸序列。此外，根据探针的化学性质、定位和用途，可将探针分为多种类型。不同种类的探针，制备方法也不尽相同。

1. 探针的种类和获取

(1) 探针的种类，根据化学组成，可将探针分为 DNA、RNA、PNA 及寡核苷酸探针：

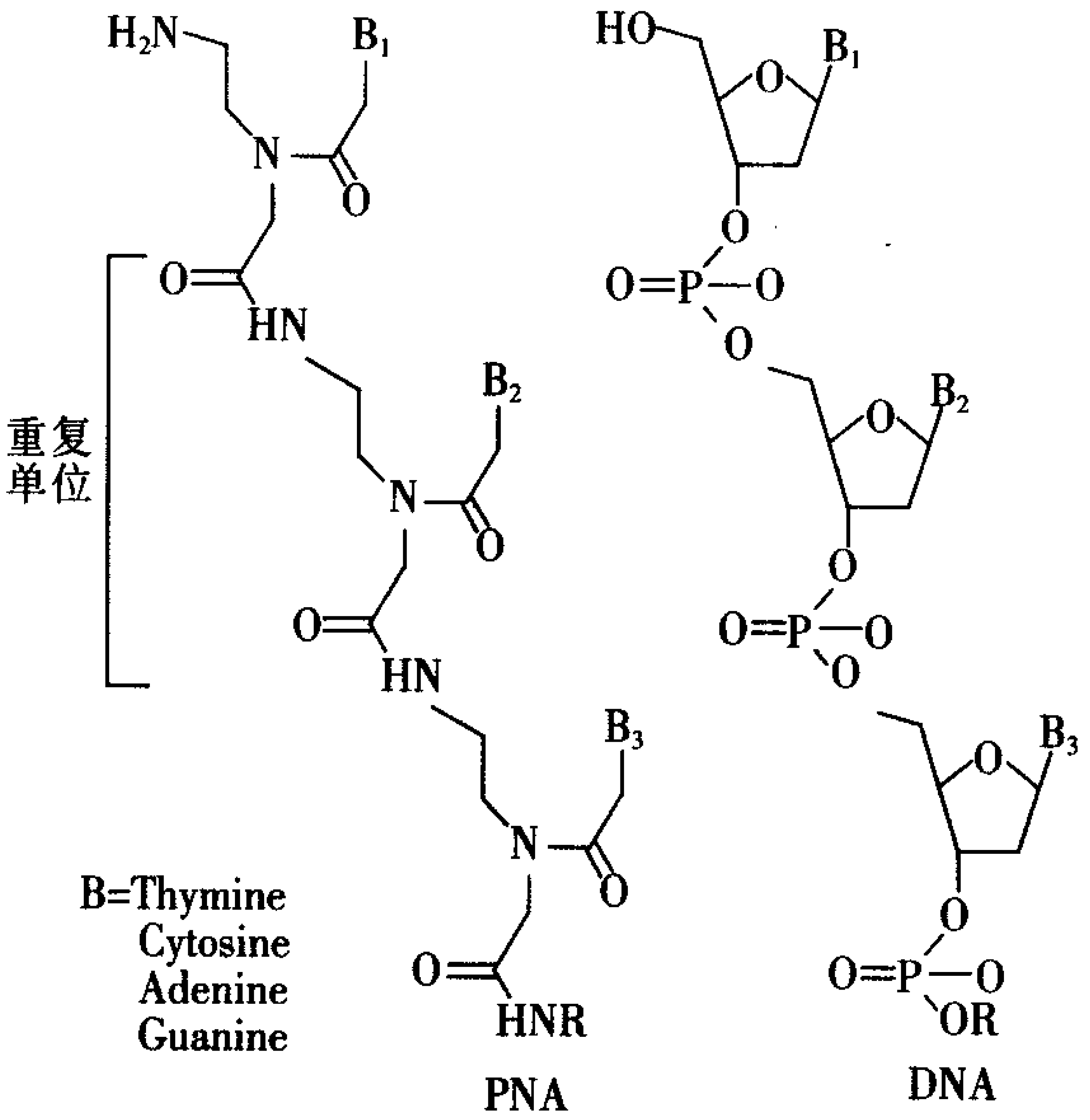
DNA 探针。这类探针应用最广，可以通过化学合成、克隆或 PCR 技术获取。

RNA 探针。一般用 RNA 聚合酶体外转录克隆的 DNA 序列获得。RNA-RNA 杂交分子在所有可能的杂交分子中最为稳定，但 RNA 探针容易被 RNase 降解。

寡核苷酸探针。它是根据探针靶序列的碱基顺序用化学方法合成的单链 DNA (single strand DNA, ssDNA)，其长度为 15～50 个核苷酸。由于分子小，因此更容易渗透到细胞的目标区域；但也正由于分子小，限制了其所能携带的荧光基团或报告分子的数目，并最终导致杂交后荧光信号较弱。因此，这类探针仅适用于对重复单位较短的高度重复序列(如染色体端粒序列)的荧光原位杂交分析。

肽核苷酸(peptide nucleic acid, PNA)探针。PNA 寡聚物是一类新型分子，其结构与 DNA 相似。但在 PNA 中，没有核糖-磷酸基骨架，其骨架是不带电的肽链(聚酰胺)，如图 10-2 所示。PNA 与 DNA 杂交时，也遵循 A-T, C-G 碱基配对原则，如图 10-3 所示。与 DNA 相比，PNA 对热稳定、与 DNA 的结合不依赖于离子强度，因此

杂交时,受探针变性温度和溶液 pH 值的影响较小。鉴于这些特点和优点,PNA 有望取代 DNA 或 RNA 作为荧光原位杂交探针。但由于 PNA 探针只能通过化学方法进行合成,而且合成费用较高,因此迄今所用的 PNA 探针还仅限于染色体的泛着丝粒(pan-centromere)和泛端粒(pan-telomere)探针。



注:PNA 的骨架由通过肽键连接的 N-I 基甘氨酸重复单位构成,碱基通过亚甲基羰基连接在骨架上,PNA 分子不带电荷。DNA 的骨架由脱氧核糖和带负电荷的磷酸基团组成,碱基通过糖苷键连接在骨架上

图 10-2 PNA 和 DNA 的结构比较

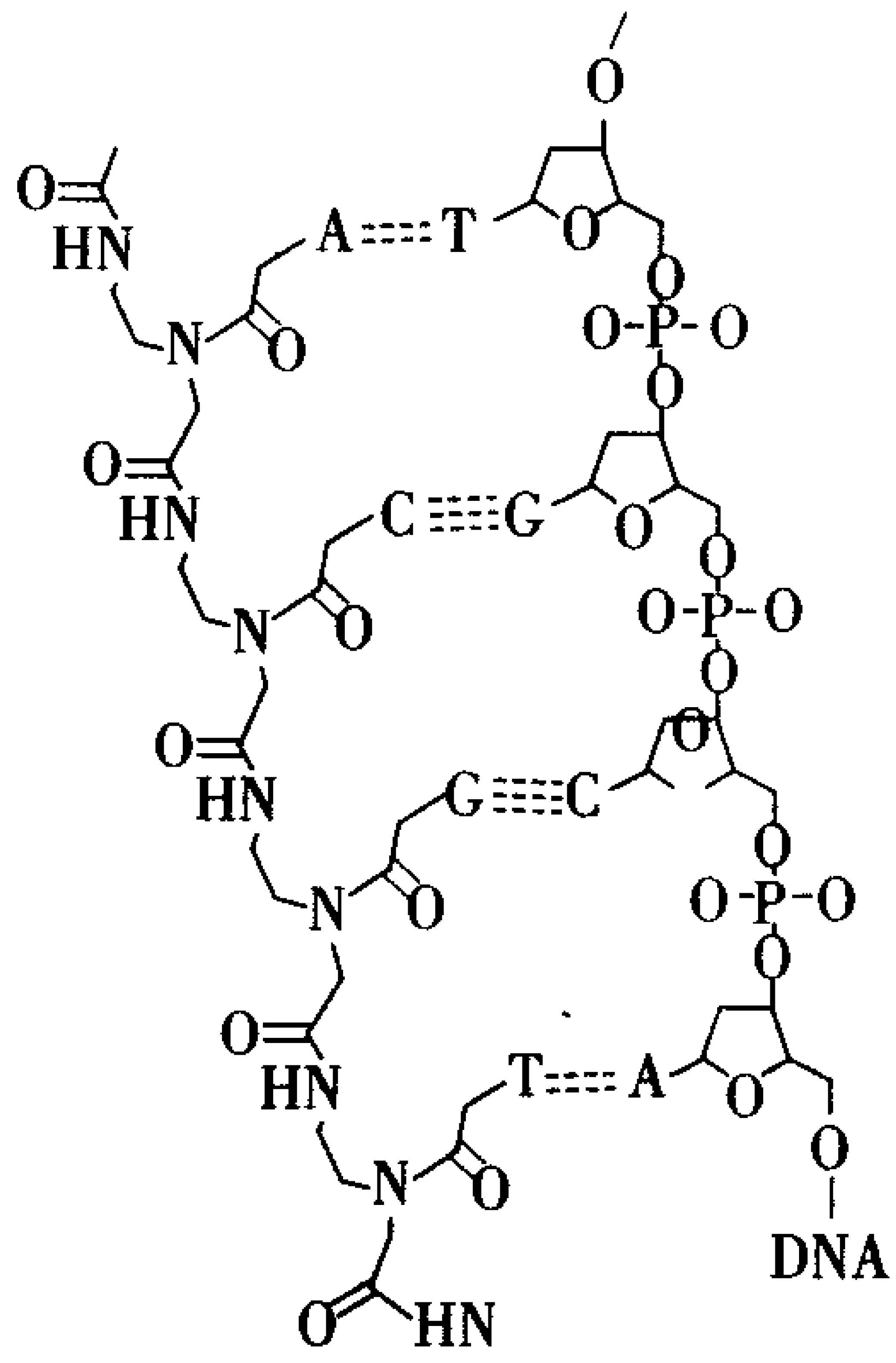


图 10-3 PNA 和 DNA 的结合遵守碱基互补原则

(2) 探针获取,获取探针的主要方法,包括化学合成、克隆和 PCR 扩增:

化学合成。对碱基序列已知的寡核苷酸探针,一般用化学方法进行合成,如人类染色体泛端粒和泛着丝粒探针的制备。

克隆法获取探针。由于 DNA 测序和基因定位工作的需要,人们构建了多种生物的染色体 YAC(yeast artificial chromosome)、BAC(bacterial artificial chromosome)、PAC (plasmid artificial chromosome)和质粒(plasmid)库等。选择库中合适的克隆,进行培养,从培养的菌体中分离提取 YAC、BAC 或 PAC DNA,将其中的插入序列分离标记后即可用作荧光原位杂交探针。对于 PAC 和质粒 DNA,由于分子较小,用常规方法提取后,即可进行标记用作探针;对于 YAC DNA,由于分子很大,不能直接用作荧光原位杂交探针,因此需要首先用脉冲场琼脂糖凝胶电泳分离出 YAC,再用酶切和 PCR 方法获取其中的插入片段,经标记后用作探针。目前,最常用也是最简便的从 YAC 中制备荧光原位杂交探针的方法有万能引物 PCR 法(universal primer PCR)和 DOP-PCR 法(degenerate oligonucleotide-primed PCR)。

对于 BAC DNA，由于分子介于 15～40kb，用作探针时，不易进入细胞与其靶 DNA 结合，但也不需要特别分离其中的插入片段，只需在探针标记时，选用适当的标记方法使获得的探针长度不大于 2kb，如选用 DOP-PCR、随机引物 PCR(random primer PCR)或随机引物法进行探针标记。

目前，多种 YAC、BAC 或 PAC 克隆均可从构建克隆的实验室或生物公司如 Invitrogen(http://clones.invitrogen.com/index.php)获取。

PCR 扩增获取探针。用全基因组、整条染色体、染色体特定区段的 DNA 或 cDNA 作为模板，进行 PCR 扩增以获取探针 DNA。根据 PCR 所用引物，可把这类探针分为染色体位点特异的探针(locus specific probes)和涂染探针(painting probes)。制备染色体位点特异的探针时，可选用上述任意一种 DNA 作为模板，但引物必须是扩增该位点序列的特异引物。制备涂染探针时，应根据研究需要，选用整条染色体或染色体特定区段的 DNA 作为模板，进行随机引物 PCR 或 DOP-PCR 扩增。制备比较基因组杂交(comparative genome hybridization, CGH)探针时，则选用完整基因组 DNA 作模板，进行随机引物 PCR 或 DOP-PCR 扩增。

基因组 DNA 可用常规方法提取；整条染色体的 DNA 一般用流式细胞仪根据分子量进行分选获取；染色体特定区段的 DNA，一般用染色体显微切割法获取，也可考虑从相应的 YAC 中分离。

2. 荧光素或(半)抗原标记核苷酸

对探针的标记是通过把荧光色素或(半)抗原标记的核苷酸引入探针序列实现的，现在绝大多数标记核苷酸均可从生物公司买到，但一般价格较高。如果用量较大，也可分别购买荧光色素和核苷酸，自行标记(标记方法参见 http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/n_coupling.html)。

原则上，dATP、dGTP、dCTP 和 dUTP 等各种 dNTP 均可被荧光素或(半)抗原标记，但在实际工作中，标记的 dUTP 和 dCTP 的应用最普遍。各种商品化的荧光色素，冷冻干燥后可在－20℃条件下保存数年；为避免荧光色素分解和荧光淬灭，只有在使用时才溶于二甲基亚砜，并分装后保存在－80℃条件下。荧光色素或(半)抗原通过胺化反应结合到核苷酸上，常用的胺反应试剂包括琥珀酰酯、异硫氰酸酯、磺酰氯等。

目前常用的荧光色素包括 Vysis 提供的 SpectrumGreen、SpectrumRed、SpectrumOrange 等，Molecular Probes 提供的 Alexa Fluor 系列荧光色素。此外，还有 FITC、Cy3、TexaRed、Rodamine 等，其吸收和发射峰如表 10-1 所示。

荧光原位杂交时常用于核苷酸标记的抗原和半抗原有地高辛(Digoxinin)和生物素(Biotin)。

表 10-1 用于直接标记的常用的荧光素/半抗原种类

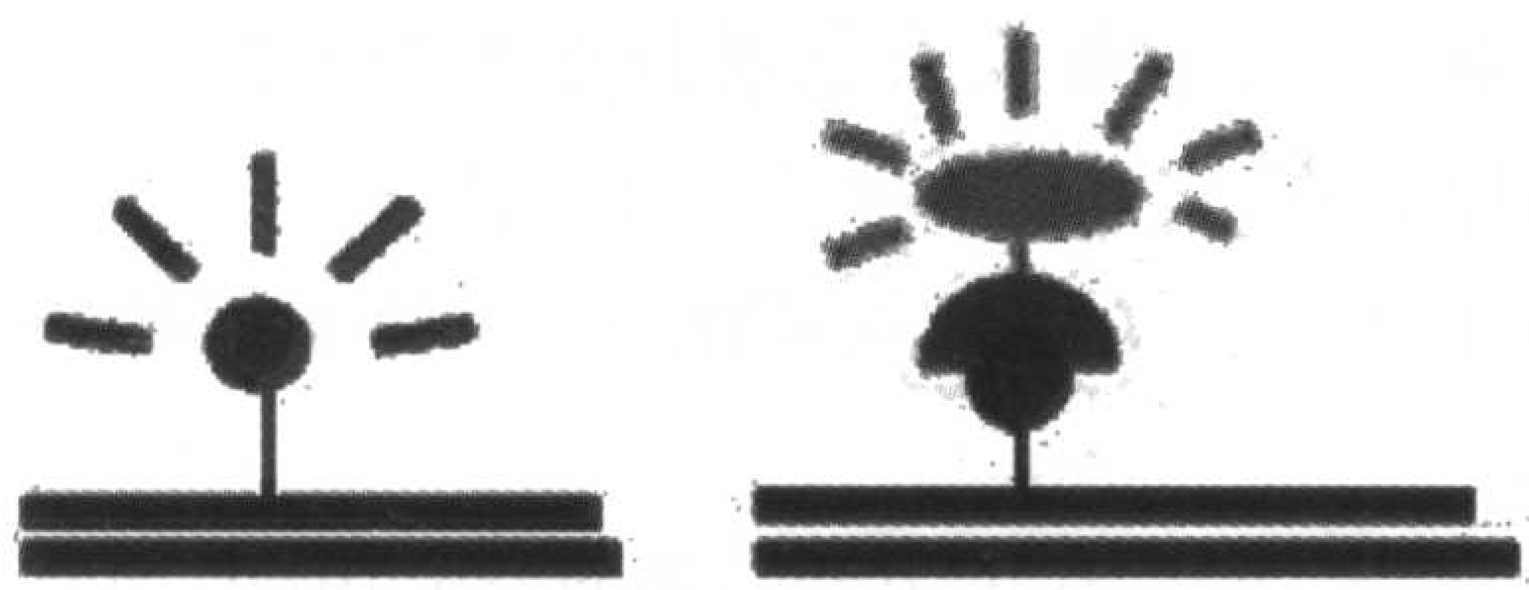
荧光素	染色剂或半抗原分子量	吸收峰(nm)	发射峰(nm)
DEAC	350	432	472
RITC	600	491	515
RGr	620	515	530
R6G	550	524	552
Cy3	750	550	570
TAMRA	640	547	573
TxR	800	583	603
Cy5	800	649	670
半抗原			
BIO	550	—	—
DIG	600	—	—

3. 标记探针

标记探针是把标记的核苷酸引入 DNA、RNA 或 PNA 的过程。根据引入的过程不同,标记方法可分为缺口平移法(nick translation)、随机引物法(random priming)、PCR 法等;根据对杂交后探针的检测方法,又可分为直接标记和间接标记两种方式。

(1) 探针标记方式:

直接标记(如图 10-4 中 A 所示)。将荧光色素分子直接连接于探针 DNA、RNA 或 PNA 上,杂交后的标本不需抗体检测即可用荧光显微镜或流式细胞仪进行分析测定。这种方法快速简便、杂交后标本上的杂信号较少。但由于直接标记探针的杂交信号不能放大,因此杂交信号较弱,故一般只用于对多拷贝序列的检测。然而随着荧光染料和荧光检测技术的不断发展,直标型探针的灵敏度也不断得到提高。



A 直接标记法　　B 间接标记法

图 10-4 探针标记方式

间接标记(如图 10-4 中 B 所示)。把报告分子(reporter molecule)如生物素或地高辛连接在 DNA、RNA 或 PNA 上,杂交后用带有荧光色素标记的报告分子的亲和物或抗体进行检测。常用的报告分子有:生物素、地高辛、2-乙酰氨基芴、二硝基苯酚、汞分子和硫化基团等。其中前两者用于标记核苷酸类似物,并以缺口平移、随机引物、PCR 或 RNA 体外转录法引入探针链,故最为常用。由于间接标记可以根据需要对杂交信号进行一次或

多次放大，因此对单拷贝序列的检测至为重要。

(2) 探针标记方法，探针标记除把带有标记的核苷酸引入探针序列，还可以将DNA 片断缩短至 500bp 以下。现将主要方法介绍如下：

缺口平移法(Nick Translation)。如图 10-5 所示，利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 5′-3′的核酸外切酶活性在核酸链上产生随机缺口，再通过其 5′-3′的核酸聚合酶活性将核苷酸添加到缺口的 3′端，从而把带有荧光色素或(半)抗原标记的核苷酸引入核酸链。缺口平移法所用的试剂可分别购买，也可利用商品化的试剂盒。下面以用 SpectrumRed dUTP 标记人 8 号染色体着丝粒 DNA 为例来说明缺口平移法所用试剂和标记过程。

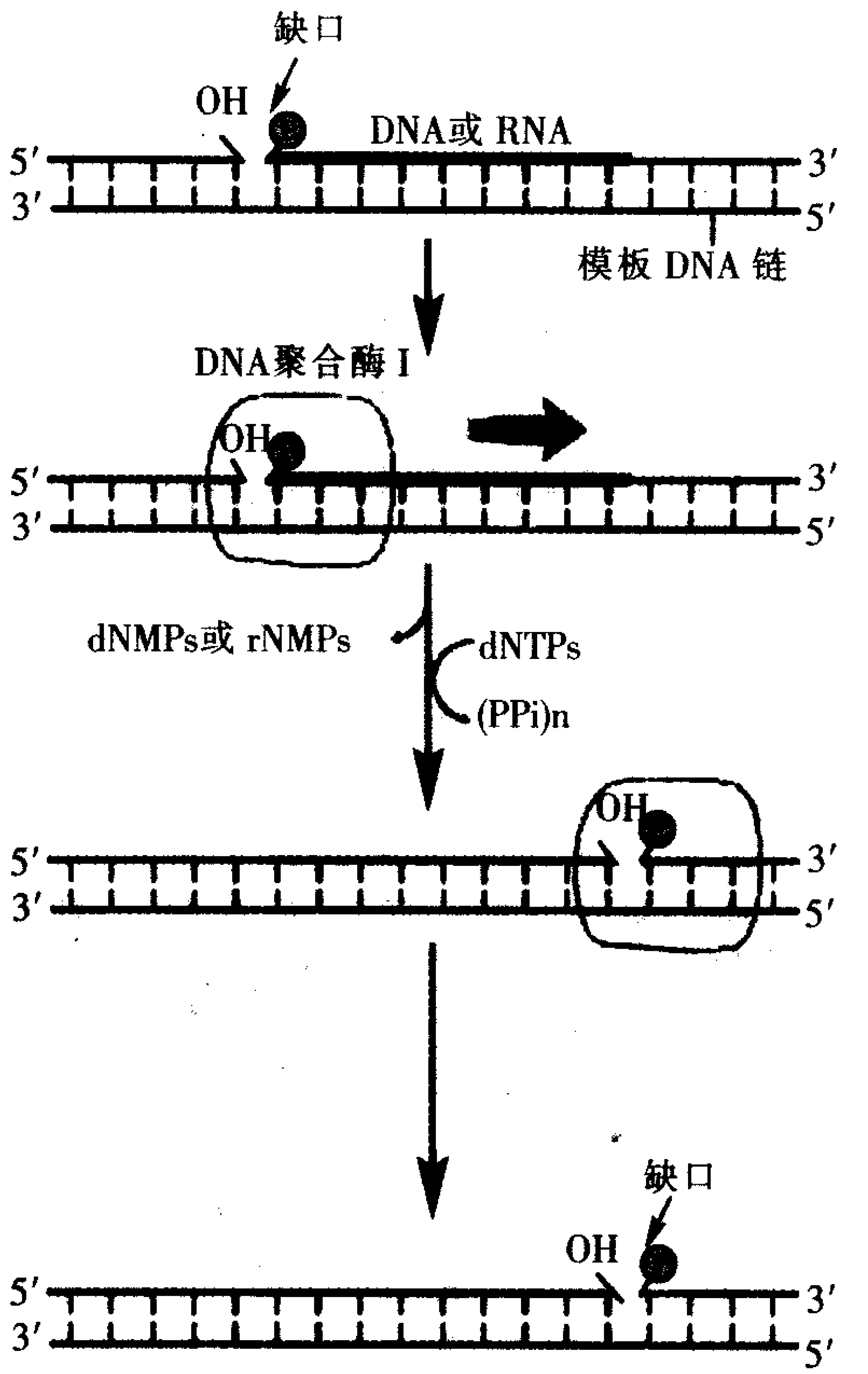


图 10-5　缺口平移法原理

Ⅰ. 试剂

ⅰ. dNTP 混合物(不含 dTTP)：含 dATP、dCTP 和 dGTP 各0.2mM，500mM Tris-HCl(pH 7.8)，50mM $MgCl_2$，100mM 2-巯基乙醇。

ⅱ. Pol Ⅰ/DNase Ⅰ 混合物：含 0.5U/μL DNA Polymerase Ⅰ、0.4mU/μL DNase Ⅰ、50mM Tris-HCl(pH 7.5)、5mM Mg-acetate、0.1mM PMSF、50% (v/v) glycerol 和 100μg/mL BSA。

ⅲ. SpectrumRed dUTP (1mM)。

ⅳ. dTTP(1mM)。

ⅴ. 终止缓冲液：0.5 M EDTA(pH 8.0)。

ⅵ. 无菌蒸馏水。

Ⅱ. 步骤

ⅰ. 把 0.5mL 离心管置于冰上，向离心管中依次加入：DNA 2μg；混合物 10μL；dTTP(1mM)1.2μL；Spectrum-Red-dUTP(1mM)0.8μL；加无菌蒸馏水至 90μL。

ⅱ. 轻轻混匀后，加入 10μL DNase Ⅰ/DNA polymerase Ⅰ；混匀，在微量离心机上离心 5s 使液体汇集到离心管底部，15℃孵育 24～72h。

ⅲ. 加入 5μL 终止缓冲液并混匀。

随机引物法(Random primer labeling)。原理如图 10-6 所示，即以变性后的探针 DNA 链为模板，在随机引物的引导下，利用 Klenow 酶的聚合酶活性把标记核苷

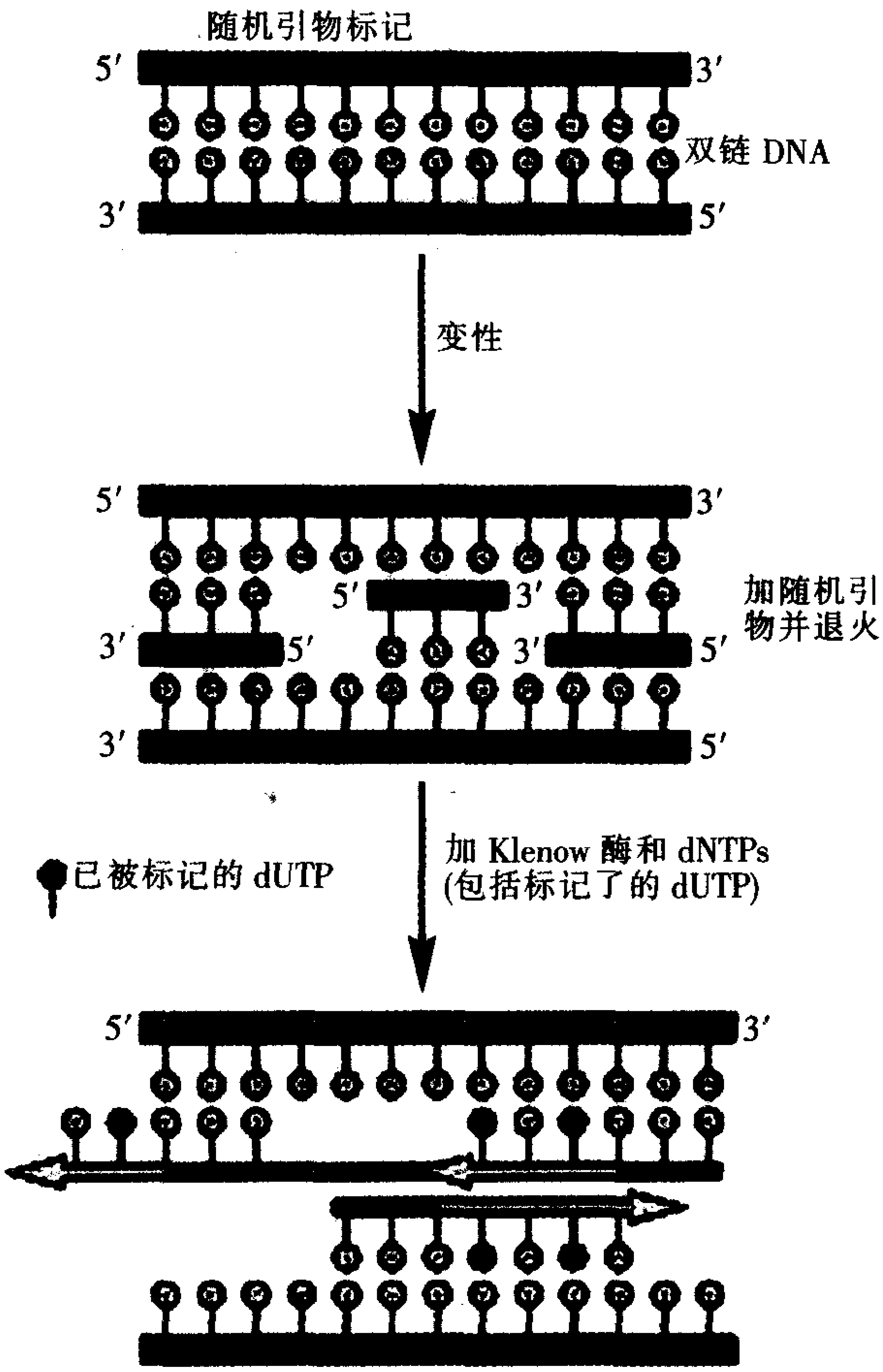


图 10-6 随机引物法原理

酸引入 DNA 链。下面以用 SpectrumRed dUTP 标记人 8 号染色体着丝粒 DNA 为例来说明随机引物标记法所用试剂和标记过程。

Ⅰ. 试剂

ⅰ. 反应缓冲液：0.67M HEPES，0.17M Tris-HCl，17mM $MgCl_2$，33mM 2-mercaptoethanol，1.33mg/mL BSA。

ⅱ. 随机引物：18 OD_{260} U/mL 寡核苷酸引物（六聚物）。

ⅲ. dNTP 混合物：含 dATP、dCTP 和 dGTP 各 0.5mM；1.2μL dTTP(1mM)；0.8μL SpectrumRed dUTP(1mM)。

ⅳ. Klenow 酶：3U/μL Klenow。

ⅴ. 终止缓冲液：0.5M EDTA，pH 8.0。

ⅵ. 无菌蒸馏水。

Ⅱ. 步骤

ⅰ. 将 25ng 人类 8 号染色体着丝粒 DNA 溶解于 5～20μL 蒸馏水，沸水处理 5min，然后迅速转移到冰浴中。

ⅱ. 向上述反应体系中加入：

6μL dNTP 混合液；0.5μL dTTP 溶液；0.5μL SpectrumRed dUTP 溶液；15μL 随机引物；加蒸馏水至总体积为 49μL，轻轻混匀。

ⅲ. 加入 1μL Klenow 溶液，轻轻混匀。

ⅳ. 25℃孵育 1～16h。

ⅴ. 加入 5μL 终止缓冲液。

注意事项：为了达到最好的标记效果，必须在标记前用酶处理使超螺旋的 DNA 线性化或者用碱变性代替热变性。

PCR 法。即用 PCR 法把荧光色素或（半）抗原标记的核苷酸引入 DNA 链中，原理如图 10-7 所示。

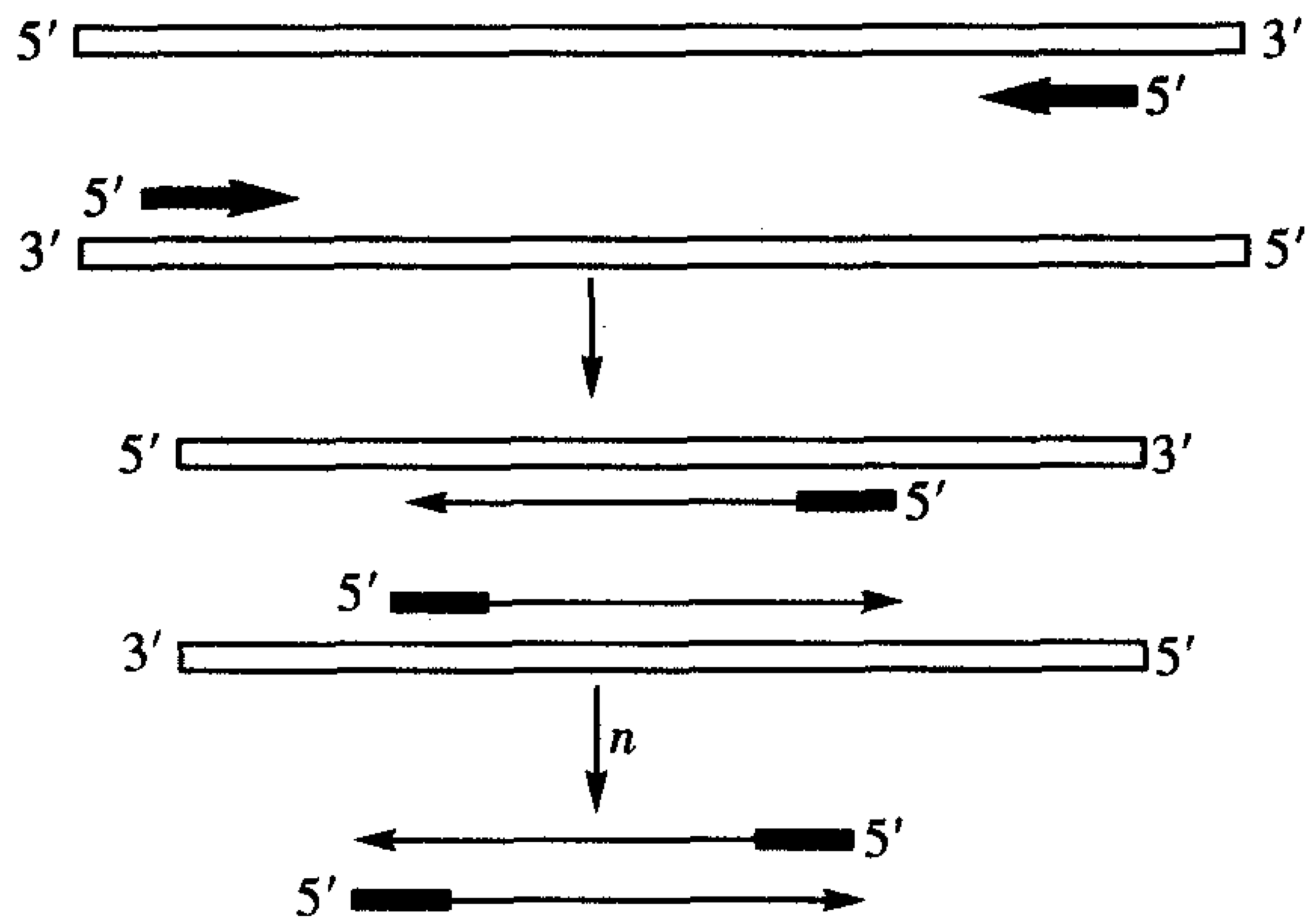


图 10-7　PCR 原理

Ⅰ. **仪器和试剂**

ⅰ. 热循环仪。

ⅱ. 10×PCR 缓冲液：500mM KCl，100mM Tris-HCl，pH 8.4；15mM $MgCl_2$；5μM 引物；5U/μL Taq 聚合酶；2mM dTTP；dNTP 混合物：含 dATP、dCTP 和 dGTP 各 5mM；1mM SpectrumRed dUTP；10ng/μL 模板 DNA。

Ⅱ. **方法**

ⅰ. 在冰浴上向 PCR 管中加入：

10μL 10×PCR 缓冲液、2～4μL 引物、4μL dNTP 混合物、5μL dTTP、10μL SpectrumRed dUTP、1μL Taq 酶、5μL DNA，加水至总体积为 100μL。

ⅱ. 混匀后，进行 PCR 反应：94℃变性 5min，然后，按下列条件进行 30 个循环：

94℃、30～60s(变性)；

50～60℃、30～60s(退火)；

69～72℃、0.5～4min(延伸)。

4. 探针标记后处理及探针纯化

探针标记反应结束后，一般不需要纯化或其他处理，即可直接用于荧光原位杂交。但当探针链过长时，可考虑用 DNA 酶处理以获取合适长度的 DNA 探针。不同 DNA 或 DNA 中核苷酸类似物的含量不同，对 DNA 酶的敏感性也有差异。

5. 探针溶液配制

荧光原位杂交时，需要把探针以合适的浓度溶于杂交缓冲液中。现在杂交缓冲液有多种，一般根据探针的长度来选用。对于长度大于 150bp 的探针，一般选用粘稠度比较大的杂交缓冲液如 MM2.1(55%甲酰胺，10%硫酸葡聚糖，1×SSC，pH 7.0)，探针浓度以 2～10ng/μL 较合适。小于 150bp 的探针，一般选用粘稠度较小的杂交缓冲液，如甲酰胺-BSA 缓冲液(70%甲酰胺，0.25% Blocking reagent，0.1%Bovine Serum Album，10mM Tris-HCl，pH 7.2)，探针浓度为 150nM。

6. 探针变性

单链 DNA/RNA 探针不需变性，如 RNA 探针、化学合成的泛端粒 PNA 探针。双链 DNA 探针杂交前需要变性为单链，变性条件一般为 70℃～80℃、3～10min。变性后的 DNA 探针一般应立即转移到冰浴中，使 DNA 维持单链状态；但对高度重复序列的 DNA 探针则需置于 37℃、15～30min，使短的互补序列复性以减少非特异性的杂交信号，该过程称为预杂交。

7. 探针评价

对于商品化的探针，商家一般都进行了质量测试，不需另做评价实验。但对于自制的探针，则必须考虑其特异性、杂交效率及信号点的大小和亮度等因素，测试其是否能满足实验需要。

(1) 杂交效率＝有杂交信号的细胞数/分析细胞数。如在用自制探针对 10 000 个 Hela 细胞进行杂交时，得到的杂交效率很高，其中 8 号染色体探针的杂交效率达

99.83%，12号染色体探针的杂交效率达99.95%。

(2) 探针特异性＝杂交信号在预期染色体上/所有有杂交信号的染色体数。

(3) 杂交信号的大小和明亮程度。杂交信号点不仅要明亮、容易辨认，还要紧密不弥散，如彩图37所示(见彩页11)。

(二) 杂交标本的制备和预处理

1. 制片

把用于荧光原位杂交检测的细胞或组织牢固地附着于玻片上，常用的方法如下：

(1) 常规空气干燥法：制备单细胞悬液，经低渗(0.075M KCl或1%柠檬酸钠)和固定(甲醇：冰乙酸)后，滴于载玻片上；

(2) 涂片：制备单细胞悬液，离心后复悬于血清或精浆中，涂片，用甲醇或4%多聚甲醛固定；

(3) 离心甩片：制备单细胞悬液，离心使附着于盖/载玻片上，用甲醛或4%多聚甲醇固定；

(4) 细胞爬片：把能附着生长的细胞直接种植于盖玻片上，用甲醛或甲醇固定；

(5) 组织切片的贴片法：组织经固定用石蜡包埋后，制成切片并粘贴在玻片上，杂交前不需再固定。

2. 杂交前预处理

预处理的目的是增加细胞的通透性，使探针容易接近靶DNA。是否需要预处理以及需要何种预处理应根据细胞种类和制片方法来确定，如空气干燥法制备的标本一般不需预处理，贴片法制备的标本必须进行脱蜡处理等。现把常用的预处理试剂和方法介绍如下：

(1) 表面活性剂：将标本在Triton X-100、Tween-20或NP-40等的2×SSC溶液中室温处理10min，溶液浓度一般为0.1%～1%。

(2) 蛋白酶：0.002%，胃蛋白酶37℃处理10～30min；0.05%～2.5%胰蛋白酶K室温处理10～30min。我们发现，对于大多数由单细胞悬液制备的标本，该步骤可省略。

(3) LIS(lthium-3,5-diiodosalicylic acid)和DTT (dithiotreitol)处理：这是精子荧光原位杂交的必需步骤。因为精子头部DNA在大量二硫键的辅助下包装非常紧密，导致探针很难进入精子头部与靶DNA结合。LIS和DTT处理可解开二硫键，使精子头部DNA松散，探针容易与之结合。

(4) 脱蜡处理：用组织切片标本进行荧光原位杂交时，需用二甲苯或氯仿去除标本中的蜡，可便于探针进入组织细胞。

3. 变性

使双链DNA解链变成单链。在早期的荧光原位杂交试验中，一般是标本和探针分别变性，称为单独变性；现在人们普遍采用标本和探针一起变性，又称共同变性。

(1) 单独变性：把标本置于68～80℃预温的变性液(用2×SSC配制的70%甲酰胺)中5～10min，－20℃预冷的70% → 85% → 100%系列乙醇脱水，快速吹干。

(2) 共同变性：标本经 70% → 85% → 100%系列乙醇脱水，快速吹干后，把探针溶液加至带有细胞的区域，加盖玻片，用胶水或指甲油封固边缘，置于 70～78℃加热板上 6～10min，然后立即转入 37℃湿盒中。

共同变性不需变性液，而且节省时间，因此已逐步取代单独变性。标本和探针变性是荧光原位杂交的关键步骤，如果变性不足，则可能导致无杂交信号或杂交效率很差；如果变性过度，则导致非特异的杂交信号增多，影响标本质量。变性温度和时间是标本和探针变性的重要参数，温度高、变性时间长，则变性程度高，反之，则变性程度差。另外，不同的组织、细胞标本其变性温度和时间也不尽相同，因此建议在用不同的标本和探针进行杂交实验时，应对变性的温度和时间进行优化，找出最理想的变性条件。

（三）杂交

杂交是使变性的探针和变性的靶 DNA 复性，形成 DNA-DNA 或 RNA-DNA 杂合体。对于共同变性的标本，在变性完成后，立即转入 37℃预温的避光湿盒中，于 37℃孵育 1～3 天。当细胞和探针分别变性时，则需把变性后的探针溶液加至经变性处理的玻片上的细胞区域，覆以盖玻片，用胶水或指甲油封固边缘后，置 37℃预温的避光湿盒中，于 37℃孵育 1～3 天。

（四）杂交后洗涤和细胞核复染

杂交后洗涤的目的是去除未与靶分子结合以及与靶分子非特异性结合的探针。一般在 2×SSC(pH 7.0)配制的 50%甲酰胺中以 40～45℃温育 15～30min。洗涤温度和时间，取决于所用探针及其靶分子的性质。如果洗涤过度，杂交信号就比较弱以致消失；如果洗涤不足，非特异的杂交信号多，影响分析结果。

杂交标本洗涤后，用细胞核染料如 DAPI (10ng/mL)室温下染色 10min，标本晾干后加 10～20μL 抗淬灭剂(如 vectashield、jackson laboratories)覆以盖玻片，即可用于分析。

（五）杂交标本分析

荧光原位杂交标本的分析，可根据实验目的选用荧光显微镜、流式细胞仪或激光扫描成像仪，一般荧光显微镜便能满足对荧光原位杂交标本的分析，其配置和分析过程如下：

1. 滤色片选用

必须根据所用荧光染料的激发和发射波长(表 10-1)来选用滤色片。

(1) DAPI, Hoechst 33258, Hoechst 33342

Ex:330～380nm; *DM*:400nm; *Em*:420nm;

(2) FITC/SpectrumGreen

Ex:455～495nm; *DM*:505nm; *Em*:515～555nm;

(3) SpectrumOrange

Ex:510～560nm;*DM*:565nm;*Em*:590nm;

(4) Texa-Red/SpectrumRed

Ex:535～585nm;*DM*:595nm;*Em*:610～685nm。

注:*Ex*:激发光滤片波长范围(excitation filter);

Em:发射光滤片波长范围(emission filter);

DM:二色向镜波长(dichromatic mirror)。

2. 图像获取

荧光原位杂交标本的图像一般用与显微镜相连的CCD照相机摄取,CCD照相机的质量直接决定了所获取图像的质量,因此选用CCD时应考虑其分辨率、灵敏度等。根据所获取的图像色彩,CCD可分为彩色和单色(黑白)两种,一般单色CCD的分辨率和灵敏度远高于彩色CCD,因此单色CCD最常用。CCD摄取图像一般由计算机软件控制,目前最常用的软件有Metamorph和Image-Pro Plus,两者虽有不同,但都可以满足荧光原位杂交标本图像摄取和分析的要求。

(1) Metamorph由美国Universal Imaging Corporation研制,目前最新版本为7.0。其主要功能包括:

控制硬件:除CCD外,还可控制其他多种硬件,如载物台(XY Stage)、Z-Motor、波长转换器(滤光片转轮)、外接快门等。

图像处理:包括背景扣除、平场校正、FFT、三维图像重建、自动去模糊、RGB图像叠加,以及荧光图像与明视野图像的叠加等。

图像分析:如计算面积、周长、长度、宽度、中心坐标位置、平均强度值、总强度值等,并可以多种方式(object, summary, histogram, scatter plot)表现出来。

(2) Image-Pro Plus是美国MEDIA CYBERNETICS公司开发的代表国际最新水平的全32位图像处理与分析系统软件。目前最新版为Image-Pro® Plus 6.1,能对真彩色和黑白图像进行处理,兼容多种标准图像格式,支持多种国际上流行的图像板卡和数字CCD摄像机。包含400多条宏命令,具有宏调用功能和C语言风格的图像分析语言,使用户能在此基础上开发出所需的专用图像处理与分析软件。此外,系统的数据处理可与MS Word和MS Excel兼容。

三、FISH技术新进展

随着荧光原位杂交技术的广泛应用,荧光原位杂交技术本身也得到长足进步,这主要表现在以下几方面:探针标记用荧光色素也由几种发展为几十种;杂交步骤和过程也分别由20多步、15h缩减为不到10步、2h;更重要的是,由最初的每次杂交用一种探针发展为每次杂交用多种探针,即由单色荧光原位杂交发展为多色荧光原位杂交,这不仅大大节省了时间和试剂,也使染色体涂染分析以及建立在其基础上的比较基因组杂交、光谱核型分析成为可能。

1. 光谱核型分析

光谱核型分析(spectrum karyotype,SKY)是一种波谱影像分析方法,它运用了光谱干涉仪(interferometer)及傅立叶变换(fourier transform),将图像中每一像素做光谱分析后再重新显示,增强了对杂交后多种荧光的辨别。其结果分显色图像和分色图像两部分,前者可于图像获取后即刻评估所有探针的杂交质量;后者用特定的SKY 软件,参照每条染色体特有的光谱特征进行分析。

利用 SKY 技术,可同时观察和分析人类全套 24 条染色体,使不同染色体在同一张图像呈现不同颜色。SKY 技术所用的染色体探针为全染色体涂染探针,其制备过程为流式细胞仪分选单条染色体,经 DOP-PCR 扩增后,用 5 种不同组合的荧光染料进行标记。标记好的各条染色体探针等量混合后,与中期分裂相进行原位杂交。杂交后发出的荧光经滤光片进入干涉仪,最终被 CCD 照相机摄取为图像。对每一像素的干涉图像经傅立叶变换后进行分析,即可得到每种发射光的光谱,对每种光谱进行分析就可得到相应的显示色和区分色;利用 SKY 软件对每条染色体的发射光光谱进行分析,即根据 5 种荧光素不同组合的发射光光谱的细微差别,使不同的染色体显示不同的颜色,从而区分人类 24 条不同的染色体。

利用 SKY 技术,能对肿瘤细胞中的染色体结构异常和数目异常进行全面分析,对染色体结构异常分析的分辨精度可达 1～2Mb,为判断标记染色体的来源提供了依据,克服了传统的染色体显带分析常常不能确定微小染色体、环状染色体和复杂易位染色体的来源的不足。但该技术不能检测染色体臂内倒位、部分臂间倒位、染色体缺失和较小的重复,对染色体断裂点的精确定位则必须用位点特异的 DNA 探针进行荧光原位杂交来验证。

2. 比较基因组杂交

比较基因组杂交(comparative genomic hybridization,CGH),是先分离出正常组织和待测组织的 DNA,进行 DOP-PCR 扩增后,分别用不同的荧光色素标记(如来自正常组织的 DNA 标以红色,待测组织的 DNA 标以绿色),然后进行等量混合,并与染色体分散良好的中期相杂交,经适当洗涤后,在荧光显微镜下通过 CCD 和 CGH 分析软件分别获取杂交图像,再把两种图像进行叠加。如果叠加后染色体呈黄色,就说明正常组织和待测组织中该染色体物质含量相同,即待测组织中该染色体的数目和结构正常;如呈红色则说明待测组织中出现该染色体的缺失;如呈绿色则说明待测组织中存在相应染色体物质的扩增。与 FISH 相比,CGH 能在一次实验中对待测样品的全部染色体扩增和缺失等检测出来,弥补了常规 FISH 每次只能检测部分染色体异常的不足。

但 CGH 不能检测平衡的染色体异常,如倒位和相互易位;对染色体缺失和扩增的检测的灵敏度也有一定限制,即只有在具有某种染色体缺失和扩增的细胞的比例达到 50%或以上时,才能被检测出来。此外,CGH 检测到的各种染色体异常,需要用相应的染色体特异的探针进行荧光原位杂交来确认。

3. 多色荧光原位杂交

多色原位杂交缩写为 M-FISH，"M"一般代表"Multicolor"，有时也用于表示"Multiplex"和"Multitarget"。M-FISH 的最大特点是：将不同的探针标以不同的荧光色素或(半)抗体，混合后进行荧光原位杂交，使杂交后的标本显示多种颜色，如彩图 38(见彩页 11)所示。彩图 38 为小鼠正常的中期染色体的多色荧光原位杂交图。

第二节 荧光原位杂交的应用

一、基因定位

利用荧光原位杂交可以直接确定基因在染色体上的位置，即基因定位。基因定位是荧光原位杂交技术在分子细胞遗传学上的最初应用，也是荧光原位杂交技术发展的原动力。

(一) 基因与染色体带型

应用高分辨 FISH 研究 Alu(SINE)和 L1(LINE)序列在人中期染色体上的分布，发现 Alu 序列主要分布在 R 带，L1 序列主要位于 G/Q 深染带。利用 FISH 检测小鼠基因组中长散在元件(LINES)和短散在元件(SINES)的分布，也发现 L1 探针结合于 G 带型的深染带，B1 和 B2 探针(SINES)主要结合于 R 带。利用 FISH 研究人类基因组中结构基因的分布，发现编码序列主要集中在染色体上 G+C(占全基因组的 35%)含量最丰富的区段。

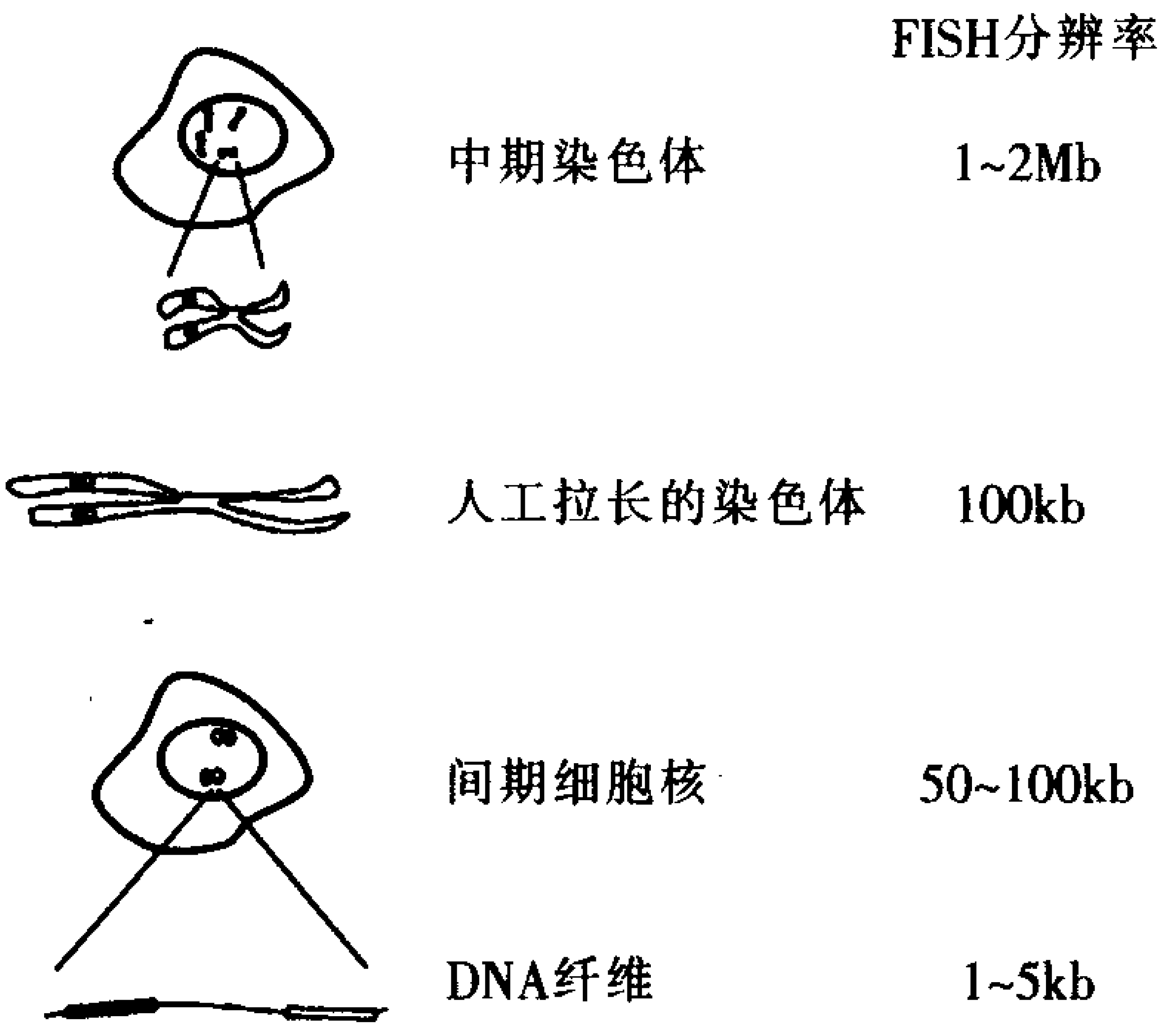
(二) 着丝粒重复序列的分布与着丝点形成

FISH 为着丝粒结构研究提供了重要手段。利用低凝集的减数分裂前期染色体和拉伸的染色体作为杂交对象，对着丝粒重复序列的重复元件如 α、β 和传统卫星 DNA 的分布进行分析，从而把两个重要的卫星重复序列定位在小鼠染色体的着丝粒部位。荧光原位杂交后，用着丝粒蛋白抗体进行检测，发现小鼠染色体主缢痕和着丝点异染色质的形成不依赖于小卫星 DNA。

(三) 端粒序列的定位

FISH 可以直接观察染色体端粒，简化了对其在核内的结构和功能研究。Werner 等用 FISH 分析发现，在普通小麦等物种中有遗传物质缺失的染色体的断裂端依然存在端粒序列，于是提出在小麦中可能存在特殊的染色体修复机制，即可在染色体的断裂端添加端粒序列，这种"端粒捕获"机制显然可以把染色体损伤稳定地保存下来。这也为染色体进化过程中亚端粒部位是断裂的"hot spots"的观察提供了可能的解释。

在利用 FISH 技术进行基因定位时，定位图谱的分辨率依赖于所用的杂交标本，如图 10-8 所示。此外，用凝集程度不同（来自不同细胞周期）的染色体进行荧光原位杂交分析，各有利弊，应根据实验目的进行选择（如表 10-2 所示）。



注：分辨率取决于染色体所处的细胞周期

图 10-8 利用 FISH 技术进行基因定位

表 10-2 利用荧光原位杂交和凝集程度不同的染色体进行基因定位的比较

实验对象	分辨率	应用	优点和缺点
中期染色体	＞1Mb	Chromosome assignment；探测嵌合现象或者同源区域	＋端粒－着丝粒定向 ＋特殊染色体区段作图 －克隆排序时分辨率不够
人工拉长的染色体	＞200kb	克隆片断排序	＋端粒－着丝粒定向 －确定克隆间的距离
间期细胞核	约 50kb～1Mb	克隆片断排序	＋能确定克隆间的距离，但不精确 －进行端粒－着丝粒定向
DNA 纤维	约 1kb～500kb	克隆片断排序	＋精确确定克隆间的距离 －进行端粒－着丝粒定向

注：＋表示能满足相应要求，－表示不能满足相应要求

二、染色体物理图谱构建

物理图谱（physical map）是在 DNA 分子水平上描述染色体的界标顺序和界标间距离的图谱。构建物理图谱的目的是分离和鉴定单个基因或基因片段，为基因组碱基测序打下基础。

构建染色体物理图谱是各种基因组计划的重要组成部分，因为现有的技术不可

能一次就把整条染色体的碱基顺序测定出来，所以，只有将染色体 DNA 切割成小片段后插入不同的生物载体，经克隆复制后分别进行碱基测序，或标记后用作荧光原位杂交探针，以确定小片段在染色体上的位置和排列顺序，从而最终完成整条染色体的碱基测序（如图 10-9 所示）。

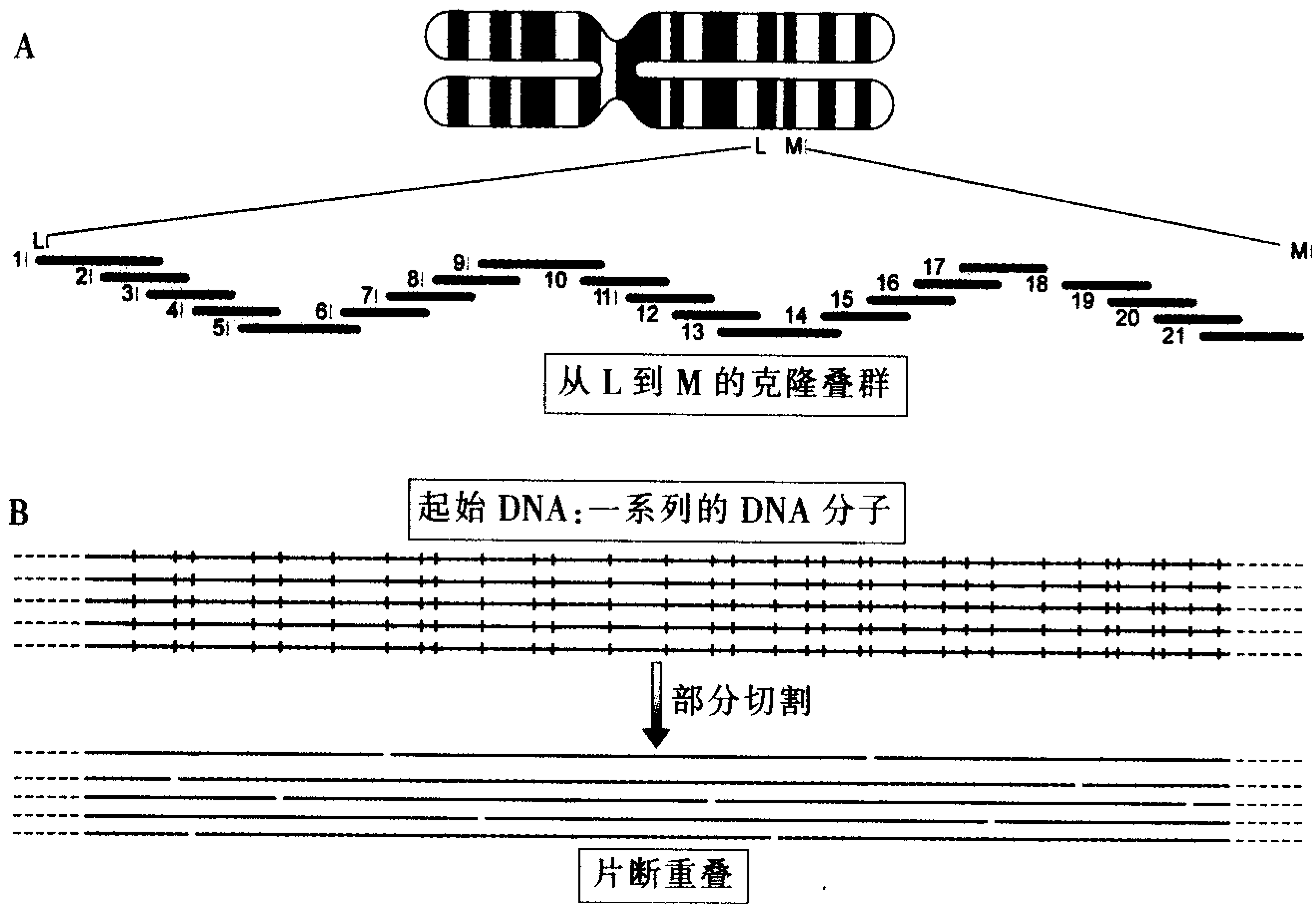


图 10-9　物理图谱的构建

染色体物理图谱的分辨率是两个不同的荧光原位杂交探针所能够检测到的最小距离，它决定了图谱的准确性。利用高分辨率的物理图谱能快速准确地确定克隆（染色体小片段）的顺序、方向及之间的物理距离，因此提高图谱分辨率成为人们不懈的追求。FISH 技术发展至今，已可以在不同凝集程度的染色体上进行基因定位，所得图谱的分辨率也明显不同，如在中期染色体上定位的分辨率约为 1～3Mb；在用离心力机械拉长的中期染色体上的分辨率则可提高 5～20 倍；在减数分裂粗线期染色体（其长度比中期染色体长 10～20 倍）上的分辨率约为 100kb；而在间期核染色质上，由于染色质凝缩程度很低，物理图谱的分辨率可达 50kb 左右；在游离的染色体上构建染色体物理图谱，即对间期核进行处理，使染色质丝失去原有的三维结构，从而进一步降低染色体的凝缩程度，可将分辨率提高至 12kb；直接利用 DNA 纤维进行荧光原位杂交以构建染色体物理图谱，则可把分辨率进一步提高 10 倍，达到 1～2kb。

三、染色体结构分析

（一）染色体结构分析

理论上认为中期染色体的两条姐妹染色单体的螺旋手性相反，但缺乏直接证据。

Baumgartner 等利用杂交信号分别位于染色单体的内侧、中间和外侧的 DNA 探针与中期染色体杂交，发现它们在姐妹染色单体上对称分布，而且这种分布在染色体从前中期到中期的不同凝集阶段保持不变，从而证实了上述假说。Bickmore 和 Oghene 用 FISH 方法研究特定 DNA 序列在中期染色体骨架上的位置，发现异染色质和常染色质 DNA 形成的环大小相同，不同的 DNA 序列可能位于距染色体轴线不同位置的区域。

（二）减数分裂染色体研究

利用荧光原位杂交，可以把 DNA 序列定位在减数分裂联会复合体(synaptonemal complex, SC)上，有助于阐明 SC 的组织结构、了解同源染色体配对和重组的机制。Moens 和 Pearlman 发现生物素化的大鼠卫星 DNA 探针与着丝粒异染色质环杂交，而端粒序列$(TTAGGG)_n$只与 SC 末端结合，表明不同的染色质区参与 SC 不同区域的形成。Scherthan 用 FISH 技术研究酵母减数分裂染色体，发现染色质凝集和同源染色体配对发生在联会复合体形成之前。此外，该技术还用于研究减数分裂重组和染色体结构异常的关系，如 Ashley 等用 FISH 方法研究 8 号染色体臂间倒位杂合子小鼠的染色体重组，进一步证实臂间倒位可抑制同源染色体重组；此外他们还发现小鼠的端粒可以促进距离在 250kb 以上的序列间的同源重组。

四、染色体数目测定

利用染色体特异的着丝粒探针，与间期或中期细胞进行荧光原位杂交，则可确定待测细胞内相应染色体的数目。该技术已广泛应用于着床前胚胎遗传学诊断(preimplanting genetic diagnosis,PGD)和产前诊断，对移植前胚胎、羊水或绒毛细胞中常发生非整倍体的 13、14、15、21 和性染色体的数目进行测定，为遗传咨询提供依据。此外，该技术还广泛用于肿瘤细胞遗传学研究，对各种肿瘤标本中的染色体组成进行分析，了解肿瘤的发生、恶化和预后与染色体数目异常的关系。在遗传毒理学中，该技术与细胞松弛素 B(cytochalasin B)诱发双核细胞技术相结合，以分析染色体分离异常，从而更精确区分环境诱变剂中的非整倍体诱导剂。最近，我们用该技术对有丝分裂后、末期和自发的双核细胞中，染色体的分配进行分析，发现染色体不分离可阻止细胞质分裂完成，提示细胞周期中可能存在防止非整倍体细胞产生的新机制。

五、研究染色体进化/比较基因组学

用来自某一物种的基因或基因片段作为探针，与不同物种的染色体进行荧光原位杂交，可以确定研究的物种间是否有同源性以及基因或基因片段在染色体上的位置，从而了解物种间的进化关系。虽然传统的染色体带型分析为染色体进化研究奠定了基础，FISH 技术的应用进一步提高了分析结果的准确性。

六、转基因的细胞学鉴定

目前，利用转基因技术将外源基因导入动植物基因组已成为改造物种的常用方法。转基因的表达与其在染色体上的整合位点有关，整合位点不同，基因的表达有明显差异。转基因的整合还可能会引起插入突变，影响对物种的改造。荧光原位杂交技术则可检测外源基因是否整合到染色体上以及整合的位点。

七、基因表达分析和临床病毒学检测

细胞和组织中 RNA 的含量是基因表达的指标，利用标记的 cDNA 作为探针与组织细胞中的 mRNA 进行荧光原位杂交，则可通过杂交信号的分布和强弱确定基因是否在相应组织细胞中表达以及表达的程度。此外，该方法还用于临床检测病例标本是否感染病毒，如确定子宫颈组织是否感染了乳头瘤病毒。

第十一章　荧光在 HER2/ErbB2/p185 研究中的应用

原癌基因 NEU 最早在大鼠的神经胶质成纤维细胞中被发现，它编码一个含 1 255 个氨基酸，分子量达 185kDa 的跨膜表面糖蛋白，该蛋白被命名为 p185。经序列分析后发现，其与生长因子受体（EGFR）有很大的同源性。随后不久，在人的 17 号染色体 q21 位置上也发现了鼠 NEU 基因的同源物，它被命名为 HER2/c-erb-B-2。HER2 受体在正常细胞中表达水平极低，但在胚胎发育期表达量很高，并证明它与 EGFR 一样在细胞的增殖和分化中起着重要的核心作用。然而，HER2 基因的过表达则会导致相应受体的过表达，这一结果与许多包括乳腺癌、卵巢癌和胃癌及肠道类癌症的发展密切相关。

在哺乳动物中，HER2/ErbB 家族由四个享有很高同源性的紧密相关的生长因子受体类分子 ErbB1、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 组成，这些受体均定位于细胞表面，并且在许多组织中都被发现。四种 HER 家族受体均由胞外区（ECD）、跨膜区（TM）和胞内区（ICD）三个大结构域组成，它们 C 末端的自身磷酸化片段通常是信号传导通路中的纽带，起着将胞外配体结合信号传递至胞内的枢纽作用。

HER 受体通常是以单体形态存在的，然而当它们与配体结合后就会形成受体二聚体，这些二聚体既可能是同二聚体，也可能是 HER 家族成员之间形成的异二聚体，由一个配体与两个受体共同形成的双体比单体形式的受体结构要稳定得多。在 HER 家族的四个成员中，HER2/ErbB2 对它们形成二聚体起了核心的作用。研究表明，配体诱导的 ErbB 受体二聚体化有严格的先后次序。HER3、HER4 只有在不存在 HER2 时，它们才与 HER1 形成异二聚体，否则它们优先选择 HER2。同样，在缺乏 HER2 的情况下 HER1 和 HER4 诱导 HER3 活化的强度也被大打折扣，所以 HER2 可能是其他 ErbB 受体家族成员传递信号的中心。

在 10 种不同的 HER 同/异二聚体结合模型中，含有 HER2 的模型存在周期最长而且传递最强的生长信号，因而与细胞恶性增殖的关系最为密切，过表达 HER2 能导致肿瘤的发生和形成。现在，已经知道的恶性肿瘤如乳腺癌和卵巢癌及部分胃癌、肺癌和口腔癌病人的肿瘤组织中均检测到了 p185 的高水平表达。其中，以乳腺癌中 p185 高表达比例最高。

在世界各地，每年有 100 万个新出现的乳腺癌病人。目前，乳腺癌已经是威胁妇女健康最主要的恶性癌症，占所有女性所患癌症的 18%。在美国，乳腺癌更占到所有诊断出的妇女所患癌症的 30%。1987 年，Slamon 等最早发现了乳腺癌与 HER2

过表达之间的关系，ErbB2 的扩增出现在约 30％的早期乳腺癌中，并且随着其表达量的增加，乳腺癌病人的存活率也随之下降，而正常组织中几乎检测不到 ErbB2 的存在，这提示 ErbB2 的过表达可以作为诊断乳腺癌的预后指标。在乳腺癌病人中，92％的 HER2 过表达是由于 HER2 基因的扩增，即产生比正常的两个拷贝更多的基因拷贝，这使得随后转录水平明显增高，从而导致 HER2 蛋白的水平上升。在肿瘤细胞中，HER2 的含量可达正常细胞表面的 100 倍以上，这种异常基因扩增的诱发机制现在尚不清楚。另外，还有少量癌症中的 HER2 过表达是因为转录及转录后加工的异常。

HER2 过表达的乳腺癌肿瘤的恶性程度高，迁移性和浸润性强，并且对化疗药物更加不敏感，治疗后复发的可能性大。现在，对乳腺癌中的 HER2 表达水平的诊断已经发展了如 Western blotting、ELISA、免疫组化、组织原位杂交等多种分析手段，HER2 在乳腺癌肿瘤组织中表达水平不仅可以定性，而且可以定量地测量。这些数据为指导和设计治疗方案起到不可忽略的辅助作用。

第一节　用免疫荧光细胞化学的方法鉴定抗体与 p185 的结合特异性

在研究诊断及治疗 HER2 过表达的肿瘤的新方法中，采用表面表位包埋法成功地从免疫小鼠身上筛选到了三株抗 HER2 的单克隆抗体。它们都特异性在 p185 的胞外区，因此用荧光标记的抗体可清楚辨别肿瘤细胞是否是 HER2 高表达。另一方面，HER2 抗体可以下调肿瘤表面 HER2 的表达，使肿瘤细胞生长受到抑制，癌变逆转，因此抗体可用于 HER2 高表达肿瘤的治疗。为此，对三株单抗之一进行了人源化改造，构建成了含有鼠源可变区和人源恒定区的嵌合抗体。新的基因工程抗体面临的第一个问题就是：它是否能特异性地结合肿瘤表面抗原 HER2。因此采用免疫荧光细胞化学的方法，用激光扫描共聚焦显微镜对嵌合抗体抗原结合特异性进行鉴定，表明它很好地保留了原有亲代鼠源单克隆抗体的结合特异性。

一、材料和方法

1. **培养细胞**

培养人乳腺癌 SK-BR-3 细胞（其表面过表达 HER2 受体）于平皿中，长满后胰酶消化传代于盛有盖玻片的培养皿（直径 3cm）内，使细胞密度为 10％～20％，37℃过夜培养。

2. **清洗**

当观察盖玻片上生长有一层培养细胞后，吸去培养液，用 0. 1mol/L PB

($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 3.31g/L，$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 33.77g/L)溶液洗涤一次。

3. 固定

在盛有细胞片的培养皿中加入 1mL 改良的 Zambon's 固定液(多聚甲醛 25g，饱和苦味酸 300mL，25%戊二醛 20mL，加 PB 溶液至 1 000mL)室温下固定 20min。

4. 洗涤

用 0.1mol/L PB 溶液洗涤细胞片 3 次，每次 3min。

5. 加一抗反应

每张细胞片上加 100μL 待测工程抗体(10μg/mL)，室温下反应 1h。

6. 洗涤

用 0.1mol/L PB 溶液将细胞片上未结合的一抗洗去，共洗涤 3 次，每次 3min。

7. 加二抗反应

每张细胞片上加 100μL 羊抗人 FITC 标记的二抗，室温下反应 1h。

8. 洗涤

用 0.1mol/L PB 溶液洗涤细胞片 3 次，每次 3min。

9. 封片

在载玻片上加一小滴防猝灭剂，将细胞片的细胞面朝下小心地覆盖在防淬灭剂上，勿使气泡进入，然后在盖玻片四周涂上少量指甲油将其封闭，使盖玻片固定不滑动并使样品与空气隔绝。

封好片的样品即可在激光扫描共聚焦显微镜下观察、采图。

二、结　果

由彩图 39 所示(见彩页 11)，细胞膜由于抗体的结合而被荧光染料染色，而细胞质、细胞核则完全没有着色，这表明工程抗体能特异性地结合膜表面抗原 HER2。

第二节　EGFP 在 ErbB2 胞内区核定位信号研究中的应用

ErbB2 是癌基因 ErbB2 编码的跨膜受体糖蛋白，属于受体酪氨酸激酶家族。由于它在细胞癌变和临床肿瘤发生及转移中的关键性作用，近些年，人们对 ErbB2 的作用机理进行了大量研究，但目标主要集中在将其作为膜受体的信号转导途径方面，如 ERK、PI3K/AKT、JNK 等途径。

有关 ErbB2 的核内定位的报道首先是在 1994 年通过酵母双杂交的方法证明 ErbB2 的胞内区与 GAL4 融合后，能够作为转录激活子。2004 年又有报道发现在体内实验中核内 ErbB2 有多个基因靶点，包括 COX-2(cyclooxygenase enzyme)基因的启动子。这个报道认为是全长的 ErbB2 出现在核里，并且确定了 ErbB2 作为转录调

节子的功能。

现在 ErbB 家族蛋白中的四个成员都已经被报道在核内出现，如表 11-1 所示。由于 EGFP(增强型绿色荧光蛋白，180kDa)、ErbB2(185kDa)和 ErbB3(185kDa)如报道中所说是受体全长进入细胞核。三个受体的分子量远远大于核孔复合物 60kDa 的最大通量，所以，这些蛋白质的入核很有可能是由蛋白本身存在核定位信号(nuclear localization signal，NLS)，它们是蛋白质内部一段 5～10 个氨基酸组成的短序列，寻找并鉴定出蛋白质内的 NLS 信号，可阐明这类膜受体蛋白入核的可能的机制。

表 11-1　ErbB 家族的入核形式及入核功能

	入核形式	入核功能
EGFP	配体＋受体全长	作为转录因子与 Cyclin D1 启动子上的 ATRS 结合
ErbB2	受体全长	作为转录调节子与 COX-2 启动子上一段序列结合
ErbB3	配体＋受体全长	未知，但该受体可在核与质间穿梭
ErbB4	受体胞内区	作为转录因子 STAT5A 的伴侣分子入核

ErbB 家族成员中最早被报道有 NLS 的是在 EGFP 内。2002 年 ErbB3 中存在的 NLS 序列也被证实，而且通过突变和缺失的实验，证明了位于 ErbB3 的 C 末端的 NLS2 才是有功能的 NLS。关于 ErbB4 胞内区的核定位信号的鉴定是在 2004 年报道的。

但是对 ErbB2 入核的机制却没有相关的阐述。通过 PSORT Ⅱ 软件分析(http://psort.nibb.ac.jp)，没有找到 ErbB2 内存在有经典的 NLS 序列，但是根据已报导显示的序列对比，发现在 ErbB2 的胞内区近膜端也同样有一段富含碱性氨基酸残基的序列(^{655} KRRQQKIRKYTMRR^{668})，它们与 EGFP 和 ErbB4 的 NLS 很相似。

EGFP 是蛋白全长加上配体一起进入细胞核，ErbB4 是胞内区入核，虽然有报道称 ErbB2 是受体全长在核中出现，但 ErbB2 到底是以什么方式入核还不十分清楚。

将 EGFP 基因与 ErbB2 的全长或分段缺失基因融合，转染细胞，在荧光显微镜下观察 EGFP 在细胞中表达的部位，可阐明 ErbB2 以全长的形式在核内出现，还是在不同的情况下以胞内区的形式进入细胞核以及这种核定位是否依赖于 ErbB2 本身含有的 NLS 信号。

一、材　　料

1. 菌株与质粒

大肠杆菌菌株为 BL21、TG-1；载体为 pEGFP-C1、p3XFLAG；质粒 pBaBe(插入

有 p185cDNA)；COS-7 细胞和 Hela 细胞株。

2. 抗体

Anti-FLAG rabbit antibody (Sigma)。

Goat anti rabbit Texas antibody (Sigma)。

3. 转染试剂

Lipofectamin 购自 Invitrogen 公司。

二、方　　法

1. p185 胞内区 ICD(Intracellular Domain)的分区预测

应用 ExPASy-PROSITE 在线分析 p185 的胞内区结构，并参照 Lin, S. Y. 等研究的 EGFP 胞内区分区，对 p185 胞内区进行分区。根据前面综述中的文献调查，认为 ErbB2 的胞内区(自 N 端 655 位到 1 234 位)之间极有可能含有 NLS 序列。但是用软件 PSORT Ⅱ (http://psort.nibb.ac.jp) 和 PredictNLS (http://cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS)均未预测出经典的核定位序列。但在与 ErbB4 对比的序列发现，ErbB2 胞内区有一段序列 KRRQQKIRKYTMRR(amino acids 655 to 668)，它有可能是一个 NLS。

2. 胞内区或其突变体与 EGFP 融合基因的构建

以 pEGFP-C1 为载体，构建多个含 ErbB2 胞内区不同片段。克隆位点位于荧光蛋白报道基因 GFP 的下游，如图 11-1A 所示。各 ErbB2 基因的长度、引物及在胞内区的位置等如图 11-1B 所示。

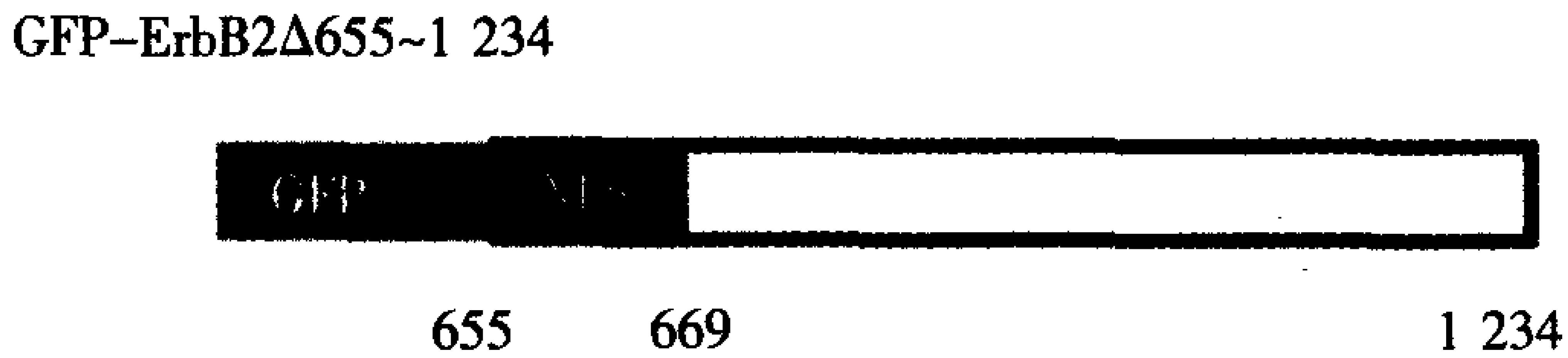


图 11-1A　ErbB2 的核定位

在某些情况下，EGFP 可能会导致一些蛋白向核内扩散，为了排除 EGFP 自身扩散造成的对细胞核定位产生影响的可能性，采用另外一种含有 FLAG 而不是 EGFP 的载体作对照，进一步证明蛋白的定位的位点。这里选用 p3XFLAG 载体，构建 FLAG 融合的胞内区全长(FLAG-ICD)和 FLAG 融合的删除 NLS 序列的胞内区全长(FLAG-ICDΔNLS)两个克隆，如图 11-2 所示。

3. 引物设计

应用 Primer 5.0，Omiga 软件进行引物设计，所使用的酶切位点 Bgl Ⅱ 和 Sal Ⅰ/Mut Ⅰ。

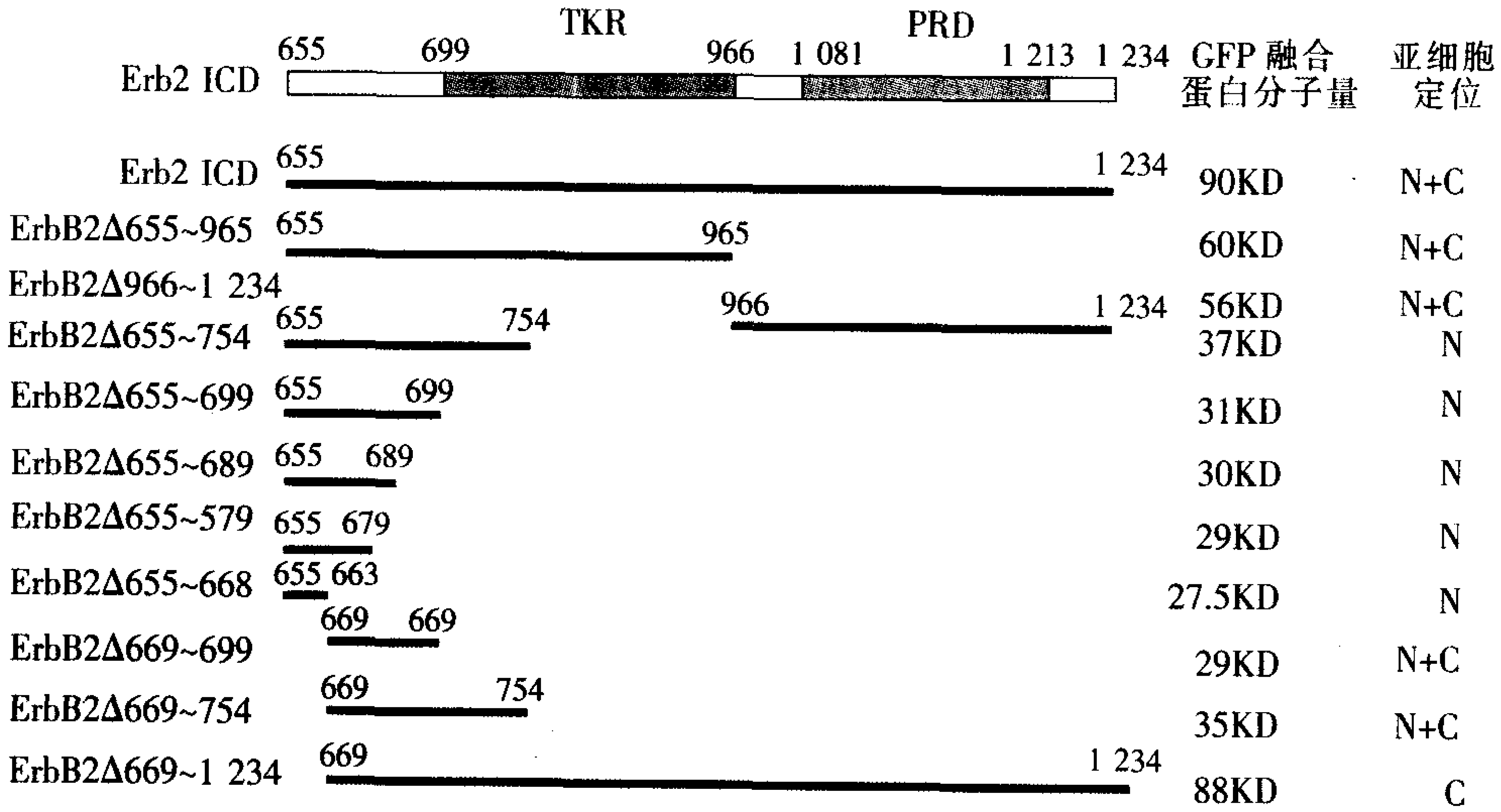


图 11-1B ErbB 胞内亚克隆示意图

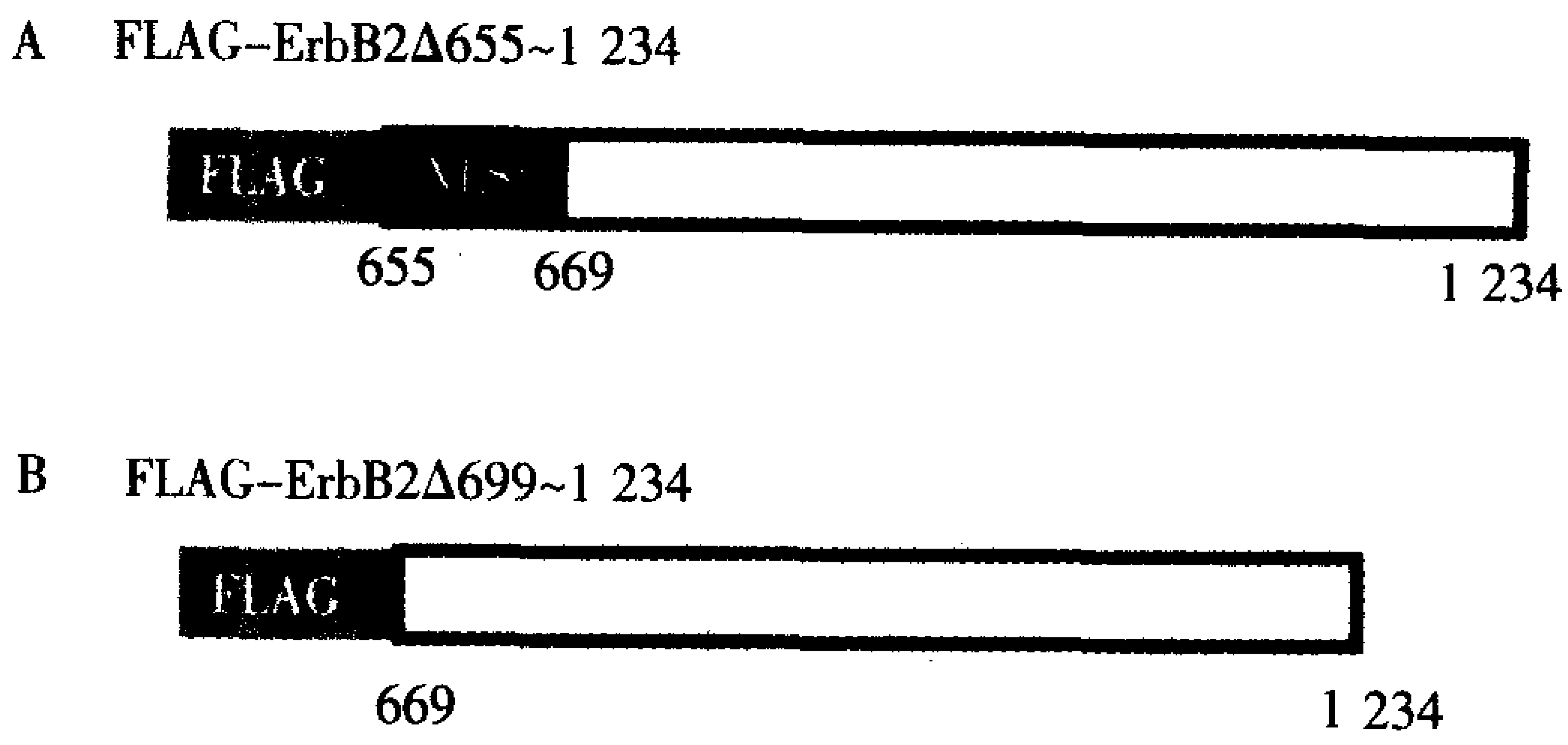


图 11-2 以 3XFLAG 为载体的胞内区克隆示意图

4. PCR 扩增

在 50μL 反应体系中，取相应的正向引物和反向引物 2.5μL，模板 pBaBe 质粒 20 ng，dNTP(每种 2.5mmol/L)4μL，10×缓冲液 5μL，1～2U Pyrobest DNA 聚合酶或 Pfu DNA 聚合酶。94℃预变性 10min。然后进入 PCR 反应：94℃ 1min，55～60℃(根据不同的引物确定退火温度)1min，72℃ 1～3min(由目的 DNA 不同的长度确定延伸时间)，28 个循环，72℃ 延伸 10min。PCR 产物回收。

5. PCR 产物及载体的酶切、回收和连接

操作参考《分子克隆》. 第 2 版(J·萨姆布鲁克，E·F·弗里奇，T·曼尼阿蒂斯著. 分子克隆. 第 2 版. 金冬雁，黎孟枫等译. 北京：科学出版社，1990.)。

6. 感受态细胞的制备、质粒的转化、质粒 DNA 的小量抽提

均按常规制备。

7. 质粒测序验证

阳性克隆进行测序，测序引物为载体上的通用引物。

8. 质粒的转染

(1) 哺乳动物细胞的复苏：

① 从液氮罐中取出冻存的细胞，在37℃水浴中迅速融化；

② 1 000rpm 离心 3min，甩下细胞，吸弃上清，用吸管加少量培养基将细胞吹打均匀；

③ 在 25mL 细胞培养瓶中加 3mL 培养基，加入细胞，若细胞数量较多可分成两瓶；

④ 放入 CO_2 培养箱中培养：5%CO_2，37℃。

(2) 哺乳动物细胞的传代：

① 轻轻摇晃培养瓶内培养基，倒入废液缸中以弃去死细胞和细胞碎片；

② 加适量 0.25% 的胰酶消化 1～2min（镜检可看见细胞收缩相互分开），吸弃胰酶；

③ 用吸管加少量培养液将贴壁的细胞吹下并吹打均匀；

④ 吸弃细胞悬液，只留下数滴，加入适量培养基（3、5、7mL /25、50、100mL 培养瓶），放入 CO_2 培养箱中培养：5%CO_2，37℃。

(3) 用 Lipofectin® Reagent 作转染试剂转染培养细胞：

① 24 孔板或 35mm 细胞培养皿接种$(1\times10^5)\sim(2\times10^5)$细胞；

② 37℃ CO_2 培养箱中培养到细胞 40%～50%融合（不同细胞所需时间不同）；

③ 方法 A：每个转染 1μg DNA＋25μL 无血清培养基，方法 B：每个转染 1μL Lipofectin＋25μL 无血清培养基；

④ 混合 A、B，温和地混匀，室温下放置 30min；

⑤ 用 500μL 无血清培养基洗细胞，洗两遍；

⑥ 每个孔转染加 150μL 无血清培养基到含 A、B 混合液的管中，温和混匀倒到板上，旋转培养板，混合液均匀铺到细胞上；

⑦ 在 37℃ CO_2 培养箱中温育 5～24h（时间不能太长，否则细胞会死很多，要随时观察）；

⑧ 一般是 5～6h 后用含血清的正常培养基替换培养板中无血清培养基，24～36h；

⑨ 15～24h 后就可以在荧光显微镜下先观察 GFP 融合蛋白的表达，若 GFP 空载体表达量很低，可以放入细胞培养箱再培养一段时间；

⑩ 等待一段时间后，取出 24 孔板，用 DMEM 1∶1 000 稀释 Hoechst。吸出 24 孔板中原来的培养基，每孔加入 500μL 含 0.5μL Hoechst 的 DMEM。放置于细胞培养箱 10min，即可拿出在荧光显微镜下观察活细胞的细胞核。

9. 间接免疫荧光

(1) 将盖玻片放于 24 孔培养板中，再铺上细胞过夜，转染 24h 后，取出有待分析细胞的载玻片，吸干上面残留的培养基后，用适量的 PBS 润洗盖玻片 2～3 次。

(2) 去 PBS，用 4%的多聚甲醛（或 4%的甲醛）固定细胞约 10min，再用适量的

0.1% Triton X-100 作用细胞约 3min。

(3) 吸去残留液体，PBS 洗 3 次，每次 10min，用 1% BSA/TPBS(0.05%Tween-20)封闭已固定细胞约 1h。

(4) 将第一种需要待分析蛋白的一抗按合适的稀释比稀释到 1% BSA/TPBS 中，并加合适的量到盖玻片上，封闭约 1h。

(5) 吸去残留液体，用适量的 TPBS 清洗盖玻片 3 次，每次 10min。

(6) 将针对第一种一抗的二抗按合适的稀释比稀释到 1% BSA/TPBS 中，并加合适的量到盖玻片上，封闭约 1h(如需加第二种一抗和二抗，重复(4)～(6)步，重复之前需用 TPBS 洗 3 遍)。

(7) 吸去残留液体，用适量的 TPBS 清洗盖玻片两次，PBS 清洗盖玻片一次，每次 10min。

(8) 加适量的 DAPI 染细胞 0.5～1min。

(9) 吸去残留液体，用适量的 TPBS 清洗盖玻片一次，PBS 清洗盖玻片两次，每次 10min。

(10) 最后吸干净残留的液体后，在载玻片中央滴一滴抗淬灭剂，然后小心地盖上盖玻片，吸去周围多余的液体，用指甲油封固盖玻片，晾干 20min 后即可观察。

三、结　果

1. 用荧光显微镜观察荧光蛋白定位

用 pEGFP-C1 作表达载体，转染 Hela 和 COS-7 两种细胞，在倒置荧光显微镜下直接观察活细胞中 GFP 融合蛋白的绿色荧光(用含血清的正常培养基替换培养板中无血清培养基后 12h 就可以看到)。

(1) ErbB2 胞内区(ICD)能转运至核。在关于 ErbB2 胞外区(ECD)断裂的研究指出，ErbB2 的胞外区断裂后会使剩下的跨膜区和胞内区活化，进而导致信号传导的增强。

将 ErbB2 胞内区(ICD)全长连在 EGFP 的 C 末端的质粒(如图 11-1A 所示)，瞬时转染 Hela 细胞，有趣的是观察到了 GFP-ICD 在核内的表达(如彩图 40 中 c、d 所示，见彩页 11)。为说明该表型的特异性，换了一个细胞株做转染。如彩图 41 所示(见彩页 12)，GFP-ICD 同样可以在 COS-7 细胞的核中表达。由于核孔复合物只允许分子量在 60kDa 以下的蛋白自由出入核，所以对于 GFP-ICD 这样一个 90kDa 的蛋白来说，入核很有可能是通过 NLS 来介导的。

图 11-1A 为 GFP 融合 ErbB2 胞内区的示意图。彩图 40(见彩页 11)为 Hela 细胞中 GFP 对照(a、b，Hoechst 染的是细胞的核)显示 GFP 是均匀分布在细胞质与细胞核；c、d 显示的是 GFP 融合胞内区全长后，蛋白定位于细胞核较多；e、f 显示的是删除 NLS 的胞内区全长融合于 GFP，蛋白仅在胞质中出现。彩图 41(见彩页 12)是

COS-7 细胞同 Hela 细胞。

(2) 确定 ErbB2 核内区的核定位信号(NLS)。为证实通过序列对比找出的 ErbB2 NLS 的假设,构建了多个含有 NLS 基因(GFP-ErbB2Δ655～699)的质粒分别转染 COS7 和 Hela 细胞,质粒构建如图 11-3 所示。其中,GFP-ErbB2Δ655～699,GFP-ErbB2Δ655～689 和 GFP-ErbB2Δ655～679 在荧光显微镜下均可观察到绿色荧光的融合蛋白定位于核(如彩图 42 中 a、b 和彩图 43 中 a、b 所示,分别见彩页 12 和 13),并且 GFP-NLS(也叫 GFP-ErbB2Δ655～668)也是定位于核的(如彩图 42 中 e、f 和彩图 43 中 e、f 所示)。这与单独的 GFP 定位于胞质和胞核是不同的(如彩图 42 中 a 和彩图 43 中 a 所示)。以上这些 GFP 融合蛋白的定位揭示了 ErbB2 中假设的 NLS 的 14 个氨基酸(KRRQQKIRKYTMRR)确是核定位信号,它单独存在就足够使胞内蛋白转运入核。

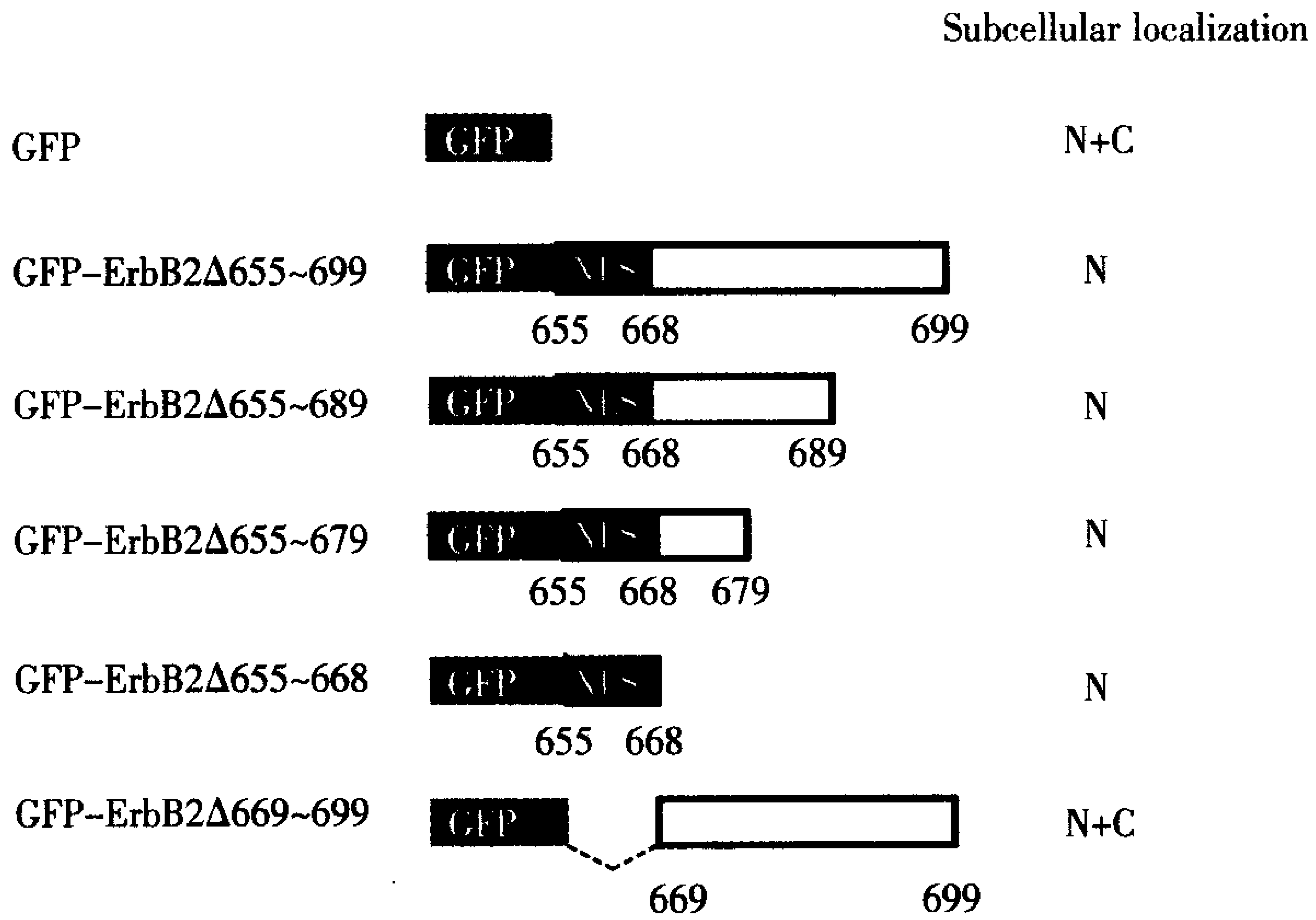


图 11-3 ErbB2 胞内区核定位的确定

图 11-3 是胞内亚区克隆示意图;彩图 42 中 a、b 显示的是 Hela 细胞转染 GFP-ErbB2Δ655～699 融合蛋白有明显的核内定位;c、d 显示的是 GFP-ErbB2Δ655～699 删去 NLS 即 GFP-ErbB2Δ669～699 融合蛋白弥散在胞质和胞核;e、f 为 GFP-NLS 融合蛋白定位于细胞核(见彩页 12)。

另一方面,是将 NLS 序列(655～668)删除而成。如彩图 42 中 c、d 和彩图 43 中 c、d 所示,删去 NLS 后,GFP 融合蛋白 GFP-ErbB2Δ669～699(分子量 29kDa)就不在核内出现,而是弥散在细胞质和细胞核。同时,为了进一步说明 NLS 对 ErbB2 胞内区的定位的作用,还构建了删除 NLS 的 ErbB2 胞内区 GFP-ErbB2Δ669～1 234(分子量 88kDa),结果如彩图 41 中 e、f 所示(见彩页 12),删去 NLS 的 ErbB2 胞内区也只定位于细胞质。

由此得出结论：NLS 的 14 个氨基酸(KRRQQKIRKYTMRR)对于 ErbB2 胞内区的核定位是必需的。

(3) ErbB2 核定位区 NLS 内的碱性氨基酸的作用。NLS 序列通常是一段富有碱性氨基酸如精氨酸(Arginine,R)、赖氨酸(Lysine,K)的蛋白序列。NLS 通常是被分为 3 种类型：第一类由 5～10 个富含碱性氨基酸残基的基序构成，称为单支短臂型，例如 SV40 的 T 抗原；另一类含两个单支短臂且由 10～20 个非保守性的氨基酸残基分隔开，被称为双支短臂型；第三种即为一级序列无明显特征性但是有核定位功能的序列，称非典型的 NLS。ErbB2 的 NLS 序列 KRRQQKIRKYTMRR 含有三簇碱性氨基酸，每簇由 2 到 3 个连续的碱性氨基酸残基组成。为确定哪一簇在决定 ErbB2 的核定位中更重要，也为了要知道这个 NLS 序列是属于哪一类 NLS，构建了 3 个分别突变每簇碱性氨基酸的克隆 GFP-mut1，GFP-mut2 和 GFP-mut3(如图 11-4 所示)。

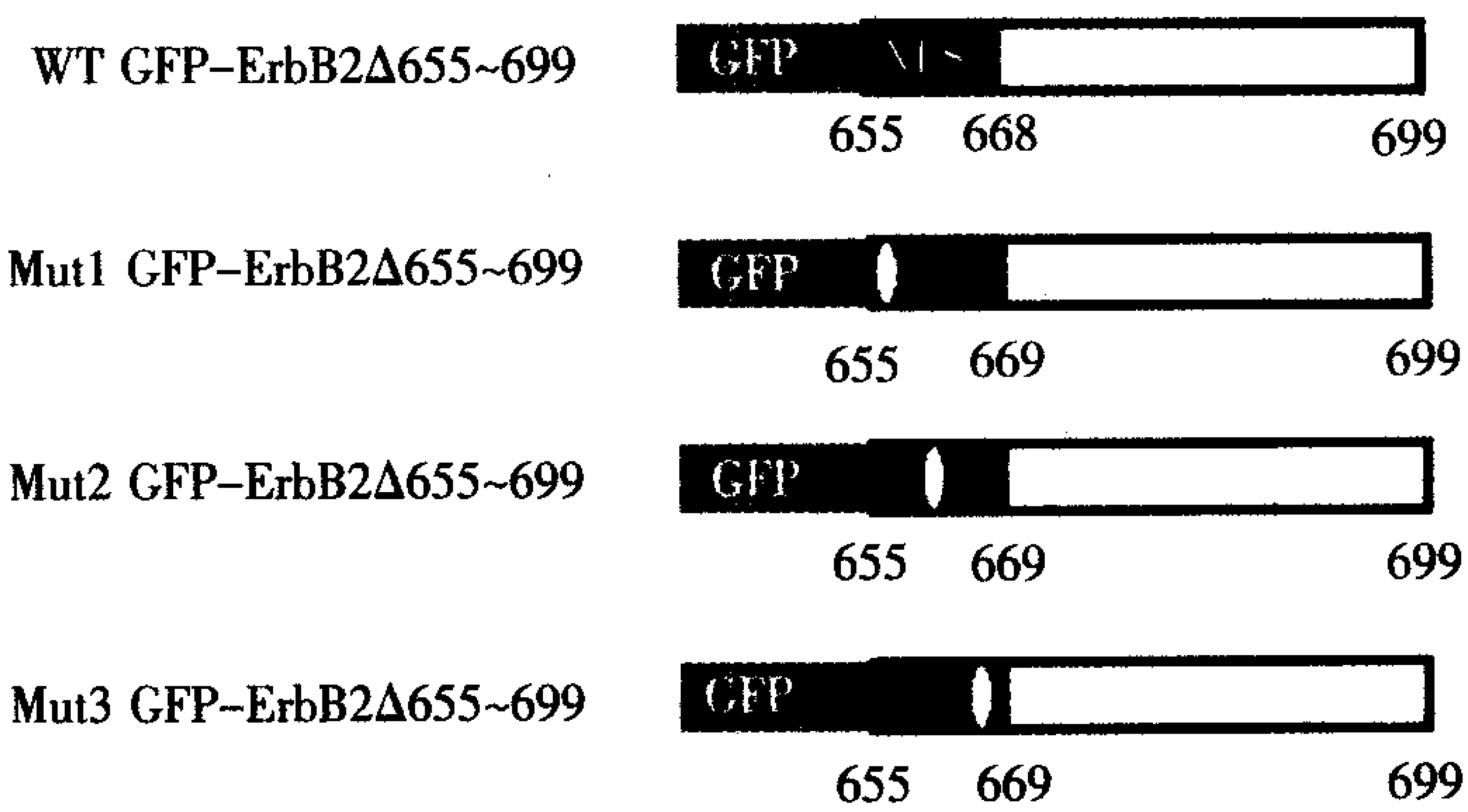


图 11-4　NLS 三簇分别突变的示意图

表 11-2 给出的是 3 个突变的序列，这 3 个突变是在 GFP-ErbB2Δ655～699 的基础上构建的。

表 11-2　ErbB2 NLS 突变部位序列总结

NLS	Sequence
WT	655 KRRQQKI RKYTM RR 668
Mut1	**TGG**QQ KI RKYTM RR
Mut2	KRRQQ**TIGT**YTM RR
Mut3	KRRQQKI RKYTM**GG**

注：突变的氨基酸用粗体表示，碱性氨基酸用下划线标出

如彩图 44 所示(见彩页 13)，在 Hela 细胞中替换 NLS 的碱性氨基酸残基破坏了融合蛋白的核定位，导致融合蛋白出现在胞质。这个结果显示，三簇碱性氨基酸残基对于 ErbB2 的核定位都是必需的。

图 11-4 为 NLS 三簇分别突变的示意图。彩图 44 为 Hela 细胞中，三簇突变都

使得融合蛋白在细胞核和细胞质弥散。因此，可以认为 ErbB2 中的 NLS 既不是单支单臂型也不是双支短臂型，而是非典型的 NLS。

2. 间接免疫荧光

如图 11-2 所示，换用 p3XFLAG（Sigma）载体上的 FLAG 标签，构建了 FLAG-ICD和 FLAG-ICDΔNLS 两个克隆。转染 Hela 细胞，用 FLAG 兔抗和德克萨斯红标记的羊抗兔二抗做间接免疫荧光（具体操作步骤请参见本节内容）。如彩图 45 所示（见彩页 14），FLAG-ICD（分子量 64kDa）主要定位于 Hela 细胞的细胞核，而 FLAG-ICDΔNLS（分子量 62kDa）只定位于细胞质。该结果进一步说明 EGFP 并未影响 ErbB2 蛋白的定位，并且 NLS 确实对 ErbB2 胞内区起到控制其入核的作用。

图 11-2 中，FLAG-ICD 和 FLAG-ICDΔNLS 分别用 a 和 b 表示。彩图 45 是 Hela细胞在转染 FLAG-ICD 和 FLAG-ICDΔNLS 之后（24h），在荧光显微镜下采集的图像。细胞固定用免疫细胞化学的方法处理。彩图 45 中 a～c 是 Hela 细胞用抗 FLAG 抗体（ErbB2 ICD，红色）（a），DAPI（DNA，蓝色）（b）和两张 Merge 后的图（c）。彩图 45 中 d～f 是转染 FLAG-ICDΔNLS 的 Hela 细胞用抗 FLAG 抗体（ErbB2 ICD，红色）（d），DAPI（DNA，蓝色）（e）和两张 Merge 后的图（f）。

关于 ErbB2 胞内区有 NLS 的结论提示了：对于 ErbB 家族或是整个受体酪氨酸激酶家族来说，通过 NLS 介导的核定位是一个家族的普遍现象。

表 11-3 中总结了目前已报道的 ErbB 家族的 NLS 序列。

表 11-3 已鉴定的 ErbB 家族核定位序列(NLS)的比较

蛋白名称	核定位序列(NLS)
ErbB1	645 **RRR**HIV**RKR**TL**RR** 657
ErbB2	655 **KRR**QQ**K**I**RK**YTM**RR** 668
ErbB4	676 **RRK**SI**KKKR**AL**RR** 688
ErbB3	1202 **RRRR**HSP 1208

注：表中碱性氨基酸残基用黑体标出。

实验证明，ErbB2 的 NLS 在胞内区有着决定其入核的功能。NLS 的 14 个氨基酸中有三簇碱性氨基酸残基，任意突变哪一簇的碱性氨基酸都会影响到其核定位。故认为该 NLS 是一个非典型的 NLS，这也是为什么软件预测时没能在 ErbB2 中找到典型的 NLS 序列的原因。

关于 NLS 中的碱性氨基酸，需进一步对 14 个氨基酸中的 8 个碱性氨基酸进行突变，找出其中对核定位起关键作用的氨基酸。这个关键性的氨基酸就能够作为一些小分子药物作用的靶点。ErbB 治疗中一种十分有效的药物 TKIs（酪氨酸激酶抑

制剂)，它是结合于 ErbB2/EGFR/VEGFR 胞内区的酪氨酸激酶区的小分子抑制剂，通过抑制激酶的活性，从而抑制 C 末端的磷酸化，进而阻止了细胞信号的传递，起到抑制肿瘤的发生、发展。设想的 ErbB2 胞内区直接进入核作为转录因子参与细胞调控的机制如果成立的话，那么设计针对 ErbB2 NLS 的小分子抑制剂就能通过抑制 ErbB2 的入核，而阻断其作为转录因子的功能，起到抗癌的功效，这将是十分有意义的。

第十二章　绿色荧光蛋白(GFP)在细胞分子生物学中的应用

早在公元一世纪，罗马自然历史学家 Pliny 报告说，将来自水母“pulmo marinus”的粘滑物涂抹在手杖上，“能像火炬一样照明指路”。今天，分子生物学家从水母中克隆了绿色荧光蛋白的 DNA，这一蛋白正是水母体内发光的原因。这种蛋白能在细胞中“照明指路”，从此研究人员能够在黑暗中观察活体细胞中蛋白的移动。

以往的细胞信号传导机制的研究，因为局限于体外方法或免疫荧光技术，都是在固定的死细胞上进行的。到了 20 世纪 90 年代，绿色荧光蛋白 GFP 技术的出现带来了细胞生物学的革命，即不需进行化学染色，就能实时地在活细胞中研究信号传导活动。

由于绿色荧光蛋白荧光稳定，不需任何反应底物及其他辅助因子，无种属限制，已在多种生物细胞中表达成功并产生荧光。一系列对于 GFP 的 N 端或 C 端融合的蛋白质性质的研究表明，融合蛋白具有与 GFP 一样的荧光性质和配体蛋白质功能，即使在甲醛或戊二醛固定的细胞中，荧光信号也不受影响，也不易发生光漂白，经 SDS-聚丙烯酰氨凝胶电泳后，仍能发射可检测到的绿色荧光，适用于与其他荧光试剂同时进行的双标实验。同时，绿色荧光蛋白的检测十分方便，用基因枪转化的受体细胞组织瞬间表达，都可以用手提紫外灯观察。用普通荧光显微镜，以蓝光或紫光激发，再选择适合的滤光片，就可以看到细胞内 GFP 荧光。所以检测 GFP 时一般不会出现假阳性结果。如果既需要观察细胞内部 GFP 荧光，又需要细胞存活，则倒置荧光显微镜、活细胞工作站以及激光扫描共聚焦显微镜都是理想的 GFP 荧光检测仪器。另外，荧光激活的细胞分选仪(也叫流式细胞仪)也可检出转化细胞。由于绿色荧光蛋白 GFP 的这些优点，近年来它已成为在细胞分子生物学研究和应用中使用最广泛的蛋白之一，越来越被人们熟知。

第一节　绿色荧光蛋白(GFP)在动物细胞分子生物学中的应用

一、探测细胞的流程

目前众多研究膜运输路径的实验已使用绿色荧光蛋白 GFP。GFP 及其突变体

一方面标记蛋白转运物,另一方面识别转运场所。被转运的蛋白的标记和转运场所的标记荧光的重新分配透露出GFP结合的蛋白质转运进程的重要线索,而这正是研究所需要的。利用这项技术,了解到Arabidopsis的ADP核糖基化因子同系物ARF1和Rab1为内质网-高尔基体转运所必须,Rab5的同系物Rha1调节其后的囊泡运输,ARF1则为稳定高尔基体形态所必须。

在实时观测活细胞体内信号蛋白活动的时候,GFP是作为常用的荧光标记。实际上,任何有兴趣研究的蛋白都能通过遗传融合表达的方法融合GFP基因,使目标蛋白带上GFP荧光标记。这种GFP融合蛋白能用来显示调节各种细胞流程的分子信号传导机制。

由于GFP的各种突变体有不同的颜色,故可用来标记不同的细胞类型,实时跟踪观察细胞迁移和运动。这种方法不需要额外的因子,也无需固定或者杀死细胞。

二、确定细胞器的定位

GFP分子量较小,能与多种不同的蛋白质N端或C端融合而保持其天然蛋白的特性,通过与某单序列融合,可特异地进行细胞核、线粒体、内质网等细胞器的定位。用GFP进行亚细胞器定位,避免了提纯蛋白、标记异硫氰酸荧光素等荧光染料、经显微注射或其他方式导入细胞的复杂方法,从而使研究蛋白在活细胞的准确定位变得简单易行。现已成功地运用GFP融合蛋白,对粗面内质网、滑面内质网、线粒体、高尔基体等细胞器进行定位。此外,GFP的应用还有利于发现新的亚细胞结构。

三、研究细胞骨架

通过免疫细胞化学技术,我们可以从固定的、静态的细胞中研究细胞骨架在细胞发育阶段的发展变化,以及对环境刺激的反应。由于传统的标记异硫氰酸荧光素的蛋白(如异硫氰基-微管蛋白)导入细胞的过程慢,并且显微注射会干扰细胞功能,所以这些技术只适用于离体细胞,而GFP的应用就能克服这些技术的缺点。

四、作为基因表达和细胞谱系的标记

作为蛋白质标记,GFP同主蛋白质的融合既保留了GFP的荧光,同时也保留了作为研究对象的蛋白质的生理功能。GFP的氨基和羧基末端都能够成功地同众多的胞质蛋白质和膜结合蛋白质相融合。当GFP以氨基末端与对象蛋白质的羧基末端融合时,通常连链接序列都不需要,如果以羧基末端与对象蛋白质的氨基末端相连,也只需要一个简单的链接序列以提高稳定性即可。就目前来看,GFP在所有尝试过的每一类细胞中都至少成功表达过一次。针对GFP的多克隆抗体在Western

blots 和免疫细胞学实验中都表现很好，即使 GFP 不能发射荧光或者失活了，都仍旧能检测到它的存在。GFP 在组织中的表达更适合较低的温度，在酵母和 Hela 细胞中，GFP 在 15℃时比 37℃时荧光更强。

五、研究蛋白质之间的相互作用和构象变化

GFP 最有力的应用之一就是探测活细胞内的蛋白质活性变化，比如蛋白质的转移，蛋白质同其他分子或蛋白的相互作用，蛋白质的构象变化等。这种探测主要依赖于叫做荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer，FRET)的现象。这是一个能探测活细胞中大分子间动力学关系的普遍安全的光谱学方法。当激活的供体的部分能量转移给受体荧光基团时，就会再次发射出长波长的光。FRET 能对单个细胞做很高分辨率和高效率的观测，相比著名的酵母双杂交而言，它都不需要往酵母核中移植这个步骤。它只需要用一个供体荧光基团标记一个大分子参与者，用受体荧光基团标记另一个，比如用不同颜色的 GFP 突变体与不同的推测可能有相互作用的蛋白相融合表达。供体的发射光谱在与受体的吸收光谱相遇时会发生显著的跃迁，要注意的是，两个吸收光谱和两个发射光谱间的差要尽量最小。比如，GFP 的蓝色突变体 Y66H 可以作供体(它的激发光谱最大是 382nm，发射光谱最大为 448nm)，而突变体 S65C 或者 S65T 则适合作受体(激发光谱最大值为 479nm 或 489nm，发射光谱最大为 507nm 或 511nm)。有报道证实，当 Y66H 和 S65C 通过一个 25 个残基的链接融合时，FRET 的确出现了。

六、研究细胞内信号传导

FRET 技术除了探测蛋白质之间的相互作用和观测蛋白质构象的变化，也为研究细胞内信号转导提供了新方法。例如：可以用 GFP 变种构建细胞内 Ca^{2+} 传感器(cameleon)，检测细胞内 Ca^{2+} 浓度。Miyawaki 等首次用它测定了哺乳动物细胞内 Ca^{2+} 浓度。他们将青色荧光蛋白(CFP)与钙调蛋白的 N 端融合表达，黄色荧光蛋白(YFP)与肌球蛋白轻链激酶(MLCK)的钙调蛋白结合域 M13 多肽的 C 端融合表达，Ca^{2+} 作用于钙调蛋白后，再与 M13 结合，就可引发 FRET，两种荧光蛋白的荧光比率可以测量出来，从而反映出细胞内 Ca^{2+} 的浓度。

七、亚细胞动力学研究

染色体组成和相关的细胞核的动力学事件日益成为研究的焦点。Kato 和 Lam 用 LacⅠ操纵子序列的串联重复作为 Lac::GFP 融合蛋白的结合位点标记 Arabidopsis 染色体。一个位点上高浓度的荧光基团，加上 charge-coupled device(CCD)和

计算机辅助图像分析系统，使得这个染色体的定位在三维空间清晰可见。通过定时重复拍摄三维图像，Kato 和 Lam 能够在二倍体保卫细胞核和更大的多倍体扁平细胞核中，将标记的荧光斑块定量化记录。他们发现尽管二者核中 DNA 含量与细胞核体积的比例相差无几，扁平细胞核移动的体积比保卫细胞核快至少 6 倍。这一结果表明扁平细胞核的组织结构不同于保卫细胞核，也许扁平细胞核中含有的染色体附着位点少一些。

八、研究细胞凋亡

细胞凋亡在正常组织发育的形态形成过程中起关键性作用，也与癌症、细胞退行性变、损伤以及自主免疫性疾病细胞的病理性死亡有关。细胞凋亡的调控机制十分复杂，根据引起细胞死亡的刺激不同，有多种途径导致细胞凋亡。目前人们正将 GFP 转染到活细胞内，通过倒置荧光显微镜观察活细胞中 GFP 出现的时间、维持的时间以及细胞内 GFP 的数量来直观地了解细胞凋亡的发生和发展过程中的细节，以证明蛋白的定位和细胞凋亡的机理(详见本书第七章的相关部分)。

彩图 46(见彩页 14)中的绿色荧光是在倒置荧光显微镜下观察到的转染到活细胞内的 GFP。

九、检测细菌

将能发出荧光的水母基因注入家禽空肠弯曲菌 DNA 中，在试验中，基因不断被激活，细菌在紫外辐射下不断地发出荧光。如果将空肠弯曲菌的不同株标上不同的颜色，它们可分别发出黄色、绿色或者蓝绿色的光来。现发现家禽的空肠弯曲菌不仅存在于空肠中，同时也存在于家禽的体表。

十、转基因动物

1. 转基因鸡

韩国用转基因技术“孵”出世界首只能发光的荧光鸡，使转基因鸡蛋向食品、制药等领域的大规模应用更近了一步。

转基因荧光鸡的体内植入了水母的绿色荧光蛋白(GFP)，在普通光线下与其他鸡无异，在紫外线照射下，嘴和羽毛发出明亮的绿色荧光。GFP 在鸡的孵化过程中表现出某种毒性，影响胚胎的发育，此次培育成功的转基因荧光鸡属于全球首例。

GFP 基因是一种标志基因，带有该基因的物种会发生荧光反应。GFP 往往与其他物种的功能基因一起植入试验物种的细胞，转基因得到的新物种如果出现荧光反应，则与 GFP 同时植入的其他物种的基因也应该存在于转基因物种的细胞内。

作为整个试验的关键部分，研究人员完成了逆转录酶病毒载体的开发，从而实现了 GFP 基因的植人。受到禽类动物卵细胞结构的限制，目前这项技术成功率很低。

鸡的孵化期为 21 天，生殖周期为 6 个月，价格低廉，适合作为转基因实验对象。而且，由于组成鸡蛋蛋清的蛋白质只有 8 种，转基因蛋白质容易从鸡蛋的成分中分离，人们期待可以用鸡蛋大量生产医药工业所需的蛋白质。

2. 转基因猴

世界首只转基因猴“安迪”在美国出世。从外表看，这只转基因猴与其他猴子没有什么两样，但实际上它体内含有“绿色荧光蛋白基因(GFP)”。在紫外线照射下，含有 GFP 的细胞会呈现绿色。培育出体内含有绿色荧光蛋白的猴子，是人类第一次培育成功转基因灵长类动物。科学家预测，这一成果将加快人类对癌症甚至老年痴呆症等病症的研究进程。

转基因猴的转基因培育过程是用一种携带“绿色荧光蛋白基因”的病毒感染猴的卵子，得到 224 个含有这种基因的卵子，经受精后，得到 40 个含有上述基因的胚胎，再将这些胚胎植入到母猴的子宫中，得到 5 只怀孕的猴子，但是最终只有 3 只母猴顺利地产下了小猴，而除“安迪”成活外，其余两只小猴已死亡。“安迪”的出世，使科学家欣喜万分，以往科学家都是通过老鼠作为实验动物来研究与人类的有关疾病，但由于老鼠与人类的差异太大，研究受到很多限制，比如很难在老鼠身上建立相关的乳腺癌模型。人们认为，“安迪”的出世弥补了以老鼠作为实验动物的许多不足，这一成果将加快人类对哺乳类动物的特异性疾病的研究进程。

3. 转基因蜘蛛蚕

中科院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所运用转基因方法，在国际上首次实现了绿色荧光蛋白与蜘蛛拖牵丝融合基因在家蚕丝基因中的插人，并获得了荧光茧。

第二节　绿色荧光蛋白(GFP)在植物细胞和分子生物学中的应用

绿色荧光蛋白(GFP)为植物细胞生物学的发展开创了新的领域。目前，已成功地运用 GFP 融合蛋白对细胞骨架、细胞器动力学、大分子运输(病毒、mRNA)、植物激素信号转导及转基因植物的生物安全性评估等进行研究。在内膜系统的运输、病毒的运动和大分子的运输等研究中，GFP 也可用于标记特异类型的细胞，跟踪细胞信号传导事件等。

一、植物细胞骨架研究

以往研究植物细胞骨架通常是采用化学染料标记的方法，将荧光标记蛋白(例如

用 Rhodamine 标记的微管蛋白)显微注射到细胞,然后用荧光或激光共聚焦显微镜对其进行监测。对具有细胞壁的植物细胞,需要较长的操作时间,并有一定的技术要求,而且只有分离或暴露的单细胞适于操作。

应用 GFP 在很大程度上可以克服以上缺点和局限性。Marc 等将微管关联蛋白4(MAP4)序列与 GFP 基因相连,转化植物表皮细胞,通过融合蛋白在植物细胞的瞬时表达,研究微管错综复杂的动力学,包括微管的重定向、延长、缩短和微管运输。Kost 等采用相似的方法,将 GFP 与小鼠踝蛋白(Talin)的肌动蛋白结合区融合成 GFP-mTn,在转烟草花粉管和转化培养的 BY2 细胞中观察到 GFP-mTn 定位于肌动蛋白的丝状体上,研究肌动蛋白在细胞中的动态变化。Mathur 等将 GFP-mTn 和 GFP-MAP4 融合物转化拟南芥,观察到丝状体发育期间肌动蛋白丝状体和微管的动态变化。

多光子显微镜可对植物器官的内层细胞进行研究,将多光子共聚焦技术与 GFP 技术结合,可以揭示出活体组织深层细胞骨架的动态本质。而在多标记实验中还可应用 GFP 的光谱突变体,如蓝色荧光蛋白(BFP)、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)等,来研究不同植物细胞骨架组分之间的相互作用,如微管和肌动蛋白相互作用的动力学研究。

GFP 融合蛋白还在质体、线粒体、液泡和细胞核中被成功地定位标记,为细胞器之间物质交换和信息交流研究提供了证据。另外,通过 GFP 与已知的细胞蛋白或者其假定的信号肽融合,可以推断这些蛋白的定位和最后的归宿。例如:GFP 与成膜蛋白融合后转化植物细胞,可以活体观察细胞板的形成过程;一系列与植物光信号转导有关的蛋白通过与 GFP 融合,可发现这些蛋白最终定位于细胞核。

就细胞骨架动力学的整体而言,尽管在荧光蛋白发现之前就已经探究过了,但是量度单个微管的行为作用在当时是不可能的。荧光蛋白却实现了这一点,Shaw 等人利用共聚焦显微镜提供精确的光漂白,研究植物微管两端的延长和缩短,发现微管共聚物两端的位置变化是由亚基的聚合和解聚造成的。利用荧光蛋白成像和光漂白作用,最终揭示出许多植物皮层的微管是通过一种聚合体的踏车机制移动。

二、细胞器动力学和内膜运输

传统的荧光染色法虽然用荧光染料可以观察一些细胞器,如线粒体和内质网的形态,但这些染料不能对细胞器进行专一染色,并且会对细胞产生一定的毒性,另外光漂白现象也较明显,因而很难对这些细胞器进行长期地观察研究。而将 GFP 与某一导肽序列融合可将 GFP 定位到特定的细胞器和膜系统中去,然后再对其进行活体观察,从而可研究不同细胞器的动态、功能以及植物的内膜系统。

人们可以随心所欲地将 GFP 导入各种细胞器,研究不同细胞器之间的相互联系,以及融合蛋白与细胞器之间的相互作用。到目前为止,最常用的与 GFP 融合的

亚细胞定位标记是内质网信号肽—— KDEL。将 GFP 与 KDEL 融合物转化植物后，不仅观察到植物内膜系统、膜泡运输，还观察到被认为是前质体的细胞器在快速运动。

Kohler 等将 GFP 与来自拟南芥叶绿体 RecA 基因的转移肽编码序列连接，从而把 GFP 导入烟草和矮牵牛的质体中。他们发现 GFP 只在叶绿体基质中表达，而类囊体中不存在荧光信号；并且叶绿体的表面不是光滑的，而是向外突出类似花粉管的管状结构，它们在细胞内时而伸长，时而缩短，有时还能与周围其他叶绿体相连。这些现象为细胞叶绿体之间能够进行物质交换与信息交流提供了佐证。

另外，GFP 与已知的细胞蛋白或者其假定的信号肽融合，还可用于研究植物中这种蛋白质的定位模式。将 GFP 与蛋白融合，可研究此蛋白在细胞内的动态变化。而应用 GFP 的几种光谱突变体，并将其融合物定位到不同的细胞器中去，可以更加深入地研究不同的细胞器和融合蛋白之间直接的相互作用。

三、大分子运输和病毒在植物体内的运动

病毒感染植物的过程十分复杂。一般认为这一过程包括经由胞间连丝的细胞之间的运动和经由微管系统进行的系统内运输。由于无法对病毒感染植物细胞的过程进行实时观测，所以对病毒感染植物的途径及机制知之甚少，GFP 的直观性观察可以监测病毒感染过程。

把 GFP 基因插入病毒基因组可以研究病毒在宿主植物体内的运动，以及病毒的运动蛋白(movement proteins，MPs)和外壳蛋白(coat protein，CP)在其通过胞间连丝的作用和功能。用 GFP 基因修饰烟草花叶病毒(TMV)并感染烟草(Nicotiana benthamiana)，激光扫描共聚焦显微镜可以观测到病毒维管束侵染路径和病毒在植物体内的积累方式。通过将 GFP 与病毒蛋白融合，已经成功地证实了病毒蛋白经过胞间连丝进入宿主细胞并与其亚细胞组分相结合。将 GFP 与烟草花叶病毒运动蛋白(MP)融合，发现 MP-GFP 定位于宿主细胞的肌动蛋白上，与此同时，离体实验亦表明 MP 可与肌动蛋白相结合；而在受感染的 BY2 细胞中，MP-GFP 定位于丝状结构中，使用微管去解聚物处理感染细胞则破坏了丝状长链，因而 MP 是与微管蛋白相结合的。这些研究表明，病毒与植物宿主组分之间的相互作用促进了病毒的局部传播。

病毒在植物体内运动的研究进展对植物细胞生物学和植物生理学有深远影响。由病毒能穿越植物的生理障碍在植物体内运动，可以推测大分子在植物体内的运输机制。Itaya 等将黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus)3a 运动蛋白和 GFP 融合转化烟草，发现融合蛋白并没有通过主要的胞间连丝运输，而是进入了复杂的次级胞间连丝系统，推测是在叶片发育的特定阶段，形成复杂的次级胞间连丝系统以运输特殊的大分子。

四、植物与微生物之间的相互作用

前面已提到，用GFP标记病毒可以实时观测病毒侵染植物的机制。除此之外，用GFP作报告基因，还可以监测细菌和真菌侵染植物的过程及相关的分子机制。在以前，一般常用荧光染料标记病原菌，由于病原菌的分裂，染料常被稀释，所以长期以来未能观察到病原菌侵入活细胞的实时动态过程。GFP的直观性观察则可以检测到病原菌的增殖情况，在检测过程中省去抗体检测或原位杂交步骤。

将GFP编码基因克隆到根瘤菌组成型启动子之后，可以稳定表达产生绿色荧光，使人们清楚地观察到根瘤菌对植物的侵染过程和与之共生的早期事件变化。Bowyer等在小麦病原菌(tapesia yallundae)中构建了含异柠檬酸酶启动子的GFP基因，监测到病原菌侵染小麦时的碳代谢过程。以GFP为荧光探针标记植物内生固氮菌，用激光扫描共聚焦显微镜也观察到了该菌对玉米植株的侵染过程以及在植物体内的定殖。

五、会发荧光的植物"哨兵"

研究人员将荧光水母蛋白基因注入到一种开花植物中，当植物在其生长环境中感受到有害的微生物或化学物质时，它就会从细胞表面向DNA发出一种生物化学信号，能发光的基因被激活，用紫外光照射植物时，它就会发出绿色的光来。这种转基因植物可以用来检测战争中的化学武器、地雷中泄露的化学物质，以及炭疽孢子等。

此外，由于近年来人们生活质量的提升，对于观赏花卉颜色也有更多的需求，Mercuri等人经由基因转化将荧光蛋白转入洋桔梗、非洲菊等观赏花卉中，利用紫外光或蓝光照射后使之产生荧光花，提高了商品价值，创造了商机。

六、GFP在植物分子生物学研究中的应用

GFP分子量小，在异源植物细胞内已成功表达并产生荧光。由于具有无需任何辅助因子即可自身发光的特性，GFP作为报告基因在农杆菌介导的或者是基因枪介导的植物遗传转化实验中，已得到广泛应用。

1. GFP在水稻基因转化中的应用研究

GFP检测方便，对基因枪转化的受体细胞组织瞬时表达和整株植物，可以用手提紫外灯观察，或用荧光显微镜以蓝光或紫光激发，就可以看到细胞内的GFP荧光。

GFP在植物中稳定表达的报道更令人振奋。Vain等人报道用基因枪方法转化水稻未成熟胚，通过愈伤组织再生得到转基因植株，在根部及暗培养的黄化幼苗中都

有明显的绿色荧光，但在绿色叶片中荧光并不明显。他们认为转化使用的目的基因启动子 CaMV35S 适用于双子叶植物，而在单子叶植物中表达较弱。由于叶绿素在蓝紫光激发下产生红色自发荧光，如果 GFP 表达量太低，前者红色荧光也可能掩盖后者绿色荧光，这也是 GFP 在植物中表达应注意的问题之一。Pang 等用植物内含子插入 GFP 基因之中以增强其表达并连接于强启动子之后，通过组织培养均得到转基因再生植株，并且绿色叶片的荧光清晰可见。目前，GFP 已在烟草、小麦、大麦、燕麦、玉米、大豆、洋葱、甘蔗、菠菜等完整的植株中获得稳定的表达。

在揭示水稻功能基因作用的研究中，GFP 扮演着一个十分重要的角色。水稻基因转化过程中，GFP 可以完全替代抗生素或除草剂筛选转基因组织，但要求发射绿色荧光的转基因组织生长均一，以便继代培养。单独采用 GFP 作为选择标记，已成功得到大麦、燕麦、小麦、水稻等转基因植株。Vain 等第一次对抗生素筛选和 GFP 筛选进行了直接地比较，报道 GFP 并不能提高水稻转化频率，而是提高了转化工作的效率，减少了转基因植株分子检测步骤和工作量。采用传统的选择标记筛选，一般需 6～8 周或更长的时间，才能鉴定出潜在的转基因苗，再经过漫长的再生植株过程后进行 Southern 杂交分析，最终确定转基因植株；而单独采用 GFP 筛选，在转化 3 周后，即能分离出转基因苗继代培养以分化成转基因植株。用 GFP 作为筛选标记，根据 GFP 发射绿色荧光的强度，还可以区分转基因植物后代中纯合体和杂合体的比例。

一些非绿色植物，如根和幼胚等，在蓝光激发下产生黄绿色荧光（自发荧光），但这种自发荧光很弱，通过调整光圈减少进光量，或选择合适的滤光片就可以清除背景，从而检测出 GFP 荧光，所以检测 GFP 时，一般不出现假阳性结果。禾谷类，包括水稻、小麦、玉米的植株都有少量自发荧光，这主要是由叶片中叶绿体的存在造成的，但绿色荧光蛋白基因表达出的绿色荧光蛋白信号比植株的自发荧光强得多，其测定不会受到自发荧光的太大影响。

2. GFP 在拟南芥基因转化中的应用研究

拟南芥（arabidopsis thaliana）为十字花科拟南芥属，一年生细弱草本植物。作为一种植物遗传学、发育生物学和分子生物学研究典型的“模式”植物，拟南芥已被公认是迄今为止 25 万余种高等植物中最好的模式材料，具有其他高等植物无可比拟的优点，被誉为植物界的“果蝇”。

实验中，构建了由拟南芥 At4g15390 基因启动子驱动的 At4g15390 promoter-GFP 重组表达载体，以农杆菌介导的浸花转化法转化野生型拟南芥，T1 代转化体收种。对转基因纯合株系幼苗的根、叶和根茎结合部位进行活体荧光观察并拍照，该发色团在 395nm 远紫外光激发，发射出 509nm 的绿色荧光。结果发现荧光信号在转基因拟南芥的不同部位都有不同程度的表达。彩图 47 中 A～D（见彩页 14）均为一周龄幼苗的 GFP 荧光图像。转化体根部荧光主要集中在植物根的维管组织区域，根尖荧光较强（如彩图 47 中 C 所示，见彩页 14）；转化体的下胚轴及叶片部位也都有荧

光的表达(如彩图 47 中 D 所示,见彩页 14)。未转基因的野生型拟南芥中,只能观察到很弱的自发荧光的存在(如彩图 47 中 A、B 所示,A 为野生型幼苗根的自发荧光,B 为野生型幼苗下胚轴的自发荧光)。荧光观察之后,在植物幼苗上滴加生理盐水,小心移放回 MS 固体培养基上,待生理状态恢复正常后,移栽土中,温室中生长,单株收种。

第十三章　免疫荧光细胞化学技术

免疫细胞化学又称免疫组织化学，其主要原理是用标记的抗体(或抗原)对细胞或组织内的相应抗原(或抗体)进行定性、定位或定量检测，经过组织化学的呈色反应之后，用显微镜、荧光显微镜或电子显微镜观察。凡是能作抗原、半抗原的物质，如蛋白质、多肽、核酸、酶、激素、磷脂、多糖、受体及病原体等都可用相应的特异性抗体在组织、细胞内将其用免疫细胞化学手段检出和研究。

免疫荧光细胞化学是现代生物学和医学中广泛应用的技术之一，是由 Coons 等(1950)建立，经过几十年的发展，免疫荧光技术与形态学技术相结合发展成免疫荧光细胞(或组织)化学。目前，免疫荧光细胞化学技术已在免疫学、细胞学、组织学、病理学中得到广泛应用。

免疫荧光细胞化学的优点为：

(1) 高度特异性：抗原抗体反应是特异性最强的反应之一，免疫荧光细胞化学所用的抗体必须是特异性强得多价或单价抗体，具有高度的识别能力，在抗原识别上可达到单个氨基酸的水平，这是其他组织化学难以相比的；

(2) 高度敏感性：免疫荧光细胞化学采用各种有效方法最大限度保存细胞和组织内待检物质的抗原性，或采用各种增敏方法，使用高度敏感的和高亲和力的抗体，可检出细胞内超微量的抗原成分；

(3) 方法步骤统一：若掌握一种技术操作方法步骤，则一通百通；

(4) 形态、机能和代谢密切结合：这是一种综合定性、定位和定量密切结合，形态、机能和代谢密切结合为一体的研究和检测技术。

免疫荧光细胞化学技术在细胞、染色体或亚细胞水平原位检测抗原分子，是其他免疫技术难以达到和代替的，它可在细胞、基因和分子水平同时原位显示基因及其表达产物，形成了新的检测系统，为生物学、医学和各个领域分子水平的研究与诊断开拓了广阔的前景。

第一节　免疫学基础知识

免疫细胞化学的全过程包括：抗原提取和纯化，免疫动物或细胞融合(单克隆抗体)，抗体效价检测和提取、标记抗体，细胞和组织切片标本的制备，免疫细胞化学反应和显色，观察和记录结果。由此可见，免疫细胞化学(包括免疫荧光细胞化学)的基

本理论是抗原抗体反应,标记化学反应和呈色化学反应。由于免疫细胞化学和原位核酸分子杂交是在细胞和组织上进行抗原抗体反应,所以,必须熟练掌握显微标本制备的全过程,要求待检标本形态结构和抗原性保存良好,抗原不从原位扩散或丢失。所以从事免疫荧光细胞化学的工作者必须了解有关理论及掌握有关细胞和组织学技术。

一、抗原、抗体的概念及抗原和抗体的关系

(一) 抗原(antigen)

凡能刺激机体产生抗体,并能与抗体发生特异性结合的物质称为抗原。物质所具有的这种特性称为抗原性(antigenicity)。

(二) 抗体(antibody)

抗体是机体受抗原刺激后,在体液中出现的一种能与相应抗原发生反应的球蛋白,称免疫球蛋白(immuno globulin,Ig)。含有免疫球蛋白的血清称免疫血清。

(三) 抗原与抗体的关系

抗原是引起机体产生免疫反应的主要外因,决定免疫反应的特异性,机体与抗原物质的斗争过程中为加速循环和排除抗原而产生的抗体、致敏淋巴细胞等物质,是机体排除异体物质的保护性反应。没有抗原的刺激,机体不能产生抗体;没有抗原物质,也无法检测抗体的存在,利用抗体可以检测抗原物质。

二、抗原的性质及种类

(一) 抗原的性质

1. 抗原的来源

抗原可以是异种异体物质、同种异体物质或自身物质。机体能对进入体内的异种、异体的大分子物质产生抗体,该物质与机体的种类关系愈远,其抗原性就愈强,机体的免疫反应也更强。例如鸭血清蛋白对鸡的免疫原性较弱,而对家兔则能引起较强的免疫反应。同种异体物质也可具有抗原性,同种不同个体之间,同一类型的细胞和组织,其抗原性也有差异,例如人的红细胞有 ABO 血型抗原及 Rh 型抗原,人类白细胞和其他组织的细胞膜上也具有组织相容性复合物的抗原物质。机体对本身所具有的物质不产生免疫反应,但在某些条件下,机体内某种物质、细胞或组织成分具有抗原性时,也可导致机体产生免疫反应,此具有抗原性的自身物质称自身抗原(autoantigen),所产生的抗体称为自身抗体(autoantibody)。如自身组织变性,机体组织或细胞在各种理化因素作用下,引起化学组成的分子排列和构型改变,形成新的抗原决定簇,例如服用安替比林等药所致白细胞减少,就是由于所服用药物改变了白细胞

的一部分表面化学结构，形成新的抗原决定簇，激活免疫活性细胞产生白细胞抗体（自身抗体），导致白细胞减少。在外伤、感染和炎症时，可能使隐蔽性抗原如精子、甲状腺球蛋白等释放，引起机体产生免疫反应。但应注意，并非异物都是抗原，例如砂尘和一些非生物性高分子聚合物，仅能激发细胞吞噬反应而不能使机体产生抗体或致敏淋巴细胞。

2. 大分子胶体

凡具有抗原性的物质，分子愈大，抗原性愈强（如细菌、蛋白质）。一般认为，抗原分子量愈大，其表面积相应较大，接触免疫细胞机会增多，在体内停留时间较长，不易排除，因而对机体刺激作用也强。一般具有免疫原性的物质，其分子量常在10 000Da以上。对于蛋白质组成的抗原，其分子量小于 5 000～10 000Da，免疫原性很弱或完全没有。但某些低分子量多肽如胰岛素（分子量 5 734Da）、高血糖激素（分子量 3 800Da）、血管紧张素（分子量 1 031Da），对实验动物还是具有一定的免疫原性。分子量小的物质团聚成的多聚体或吸附于其他胶体（载体）表面，形成大分子表面结构时，如和蛋白质结合即具有大分子胶体特性，可使小分子物质获得或增强抗原性，如细菌的多糖成分、青霉素等化学药物。

3. 抗原的特异性

各种抗原物质的化学组成虽然很复杂，但能刺激机体产生抗体并与抗体反应相结合的化学组成仅仅是抗原物质表面的一些具有活性的化学基团、化学结构及空间构型，称为抗原物质决定簇（antigenic determinant）。各种抗原物质各有其特异的抗原决定簇，但不同的抗原物质常含有共同的抗原成分，称为类属抗原。在分类上相近的种类之间的同一类蛋白质抗原，可表现出类属抗原关系。多种物质结构的相似性，决定这些物质抗原上的类属关系，而分子结构的差异性，决定各种物质的抗原特异性。

具有大分子量的异物，无论具有何种构型，基本上具有免疫原性，但明胶和核酸免疫原性很弱或无。免疫原的抗原决定簇是否暴露、抗原决定簇之间的距离是否适当，对于免疫原性强弱亦有很大影响。凡暴露的抗原决定簇的数目多、间距大，免疫原性也就较强。能与抗体分子结合的抗原决定簇的总数，称为抗原的结合价。简单的半抗原一般只能与一个抗体分子结合，是单价抗原。根据抗原分子大小推算，有 100 个氨基酸的多肽，约有 14～20 个不重叠的抗原决定簇，即有 14～20 个抗原结合价。

（二）抗原的种类

常见的抗原物质种类很多，如病原微生物及其代谢产物（毒素），异种动物血清（各种抗毒素，免疫血清的来源），同种血型抗原，同种异体皮肤、器官等组织抗原，自身组织抗原，肿瘤细胞抗原。具有抗原性的各种化学成分有蛋白质、脂蛋白、多糖体、脂多糖、糖蛋白、多肽以及核蛋白等，这些抗原物质均可刺激机体产生抗体或细胞免疫反应。根据引起抗体产生的特点，抗原可分为完全抗原和不完全

抗原两大种类。

(1) 完全抗原,完全抗原是指能在机体内引起抗体形成(免疫原性),并可与其抗体特异性结合(反应原性)的物质。如细菌、蛋白质等。

(2) 不完全抗原或称半抗原(haPten)在体内单独存在时不引起抗体产生,当其与蛋白质或胶体颗粒结合后,则可引起抗体形成。半抗原可与其特异性抗体结合,如细菌的多糖和类脂质等。在半抗原与蛋白质结合物中,一般是蛋白质使结合物具有抗原性,而半抗原则决定结合物的抗原特异性。例如,以半抗原与蛋白质 A 结合免疫动物,产生抗半抗原 a 的抗体,不仅可以和结合在蛋白质 A 上的 a 抗原结合,也可以和结合在蛋白质 B 上的抗原结合。

三、抗体的性质和种类

(一) 抗体的一般性质

抗体是免疫球蛋白(immunoglobulin,Ig),人类免疫球蛋白有五类,即 IgG、IgA、IgM、IgD 及 IgE。

IgG 分子由 4 条对称的多肽链用二硫键以共价和非共价键联结组成,其中两条长链(由 420~450 个氨基酸组成)称为重链(heavy chain,简称 H 链);两条短链(由 212~214 个氨基酸组成)称为轻链(light chain,简称 L 链)。重链占 IgG 分子的2/3,轻链占 1/3。这个四链结构是各类免疫球蛋白的基本结构,可用通式 L_2H_2 表示,L_2H_2 称为一个单体,IgG、IgD 和 IgE 都是单体,而分泌性 IgA 含两个单体,IgM 含有 5 个单体。L 链根据抗原体的不同分为 K(Kapa)型和 A(Lambda)型,又可分为若干个亚型。多肽链的羧基端称为 C 末端,氨基端称 N 末端。多肽链的 N 末端包括 L 链的 1/2 和 H 链的 1/4,氨基酸顺序随免疫的抗原不同而异,称为可变区(variabl region,V 区)。多肽链的羟基端包括 L 链 1/2 与 H 链的 3/4,氨基酸顺序排列比较稳定,称为稳定区(constant region,C 区)。免疫球蛋白结合抗原的不同特异性,决定于 L 链和 H 链的 V 区氨基酸的种类和顺序的不同;而免疫球蛋白结合补体或巨噬细胞等生物活性,则与 H 链的 C 区有关。免疫球蛋白的主要生物活性是:与抗原的特异性结合,活化补体,与细胞如巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞、肥大细胞及嗜碱性细胞结合和抗体的选择性传递等。

(二) 抗体的种类

1. 根据获得抗体的不同分类

(1) 免疫抗体:患传染病后或经人工注射疫苗后产生的抗体、用已知抗原免疫动物产生的抗体、用单克隆抗体技术制备的抗体,近年还可用基因工程制备抗体;

(2) 天然抗体:是指未患传染病也未注射疫苗而在体内出现的抗体;

(3) 自身抗体:是机体对自身组织成分产生的抗体。

2. 根据抗原与抗体在试管内是否出现肉眼可见的反应进行分类

(1) 完全抗体:此抗体能与抗原结合,在一定条件下出现可见的抗原抗体反应;

(2) 不完全抗体:此抗体能与相应的抗原结合,在一定条件下不出现可见的抗原抗体反应。

完全抗体具有完全的 Ig 分子结构,经酶水解后的片段 Fab 或 $F(ah)_2$,可表现出不完全抗体的作用。不完全抗体与抗原结合后,抗原表面便具有抗体球蛋白的特性,如与抗球蛋白抗体作用后,则出现可见的反应。

四、抗原与抗体的反应

抗原与抗体的反应统称为免疫学反应,在体内进行的抗原抗体反应称为免疫反应,在体外进行的抗原抗体反应称为血清学反应。由于抗原的物理性状不同,参加反应的因素不同(有的有补体或吞噬细胞参加),因此在抗体与抗原反应时,可表现出各种形式的反应。

1. 抗原与抗体的结合是高度特异性的结合

抗原与抗体的结合是二者分子表面物理化学吸附现象,抗原抗体复合物在一定的条件下可以解离。

2. 抗体结合价

一个抗体分子有两个抗原结合点(称两价),在一个抗原分子上则可有许多个结合点(称为多价)。抗原与抗体分子的结合,不受两者数量比例的限制,但如需要出现肉眼可见的反应,则抗原与抗体的量需保持一定比例。在抗原或抗体过量的条件下不能聚合成大颗粒,因此不能出现肉眼可见的反应。

3. 主要的血清学反应

有 3 个类型,即凝集反应、沉淀反应和有补体参加的各种血清学反应。

第二节　免疫荧光细胞化学的原理

免疫荧光细胞化学是根据抗原抗体反应的原理,先将已知的抗原或抗体标记上荧光素制成荧光标记物,再用这种荧光抗体(或抗原)作为分子探针检查细胞或组织内的相应抗原(或抗体)。在细胞或组织中形成的抗原抗体复合物上含有荧光素,利用荧光显微镜观察标本,荧光素受激发光的照射而发出各种颜色的荧光,可以看见荧光所在的细胞或组织,从而确定抗原或抗体的性质、定位,以及利用定量技术测定含量。用荧光抗体示踪或检查相应抗原的方法称荧光抗体法,用已知的荧光抗原标记物示踪或检查相应抗体的方法称荧光抗原法,这两种方法总称免疫荧光技术,以荧光抗体方法较常用。用免疫荧光技术显示和检查细胞或组织内抗原或半抗原物质等方

法称为免疫荧光细胞(或组织)化学技术。

在免疫荧光细胞化学中,单克隆抗体的应用日益增多,将会不断提高其特异性、敏感性和应用范围。共聚焦激光扫描显微镜的应用大大扩展了免疫荧光细胞化学的应用范围。免疫荧光细胞化学的特异性、快速性和其在细胞和分子水平定位的敏感性与准确性,使其在免疫学、微生物学、细胞和组织学、病理学、肿瘤学以及临床检验学等生物学和医学的许多方面得到广泛应用,日益发挥重要的作用。

免疫荧光细胞化学分直接法、间接法(夹心法)。

一、直接法

(一) 检查抗原法

这是最早的方法,用已知特异性抗体与荧光素结合,制成荧光特异性抗体,直接与细胞或组织中相应抗原结合,在荧光显微镜下即可见抗原存在部位呈现特异性荧光。此法很特异、简便,但一种荧光抗体只能检查一种抗原,敏感性较差,如图13-1所示。

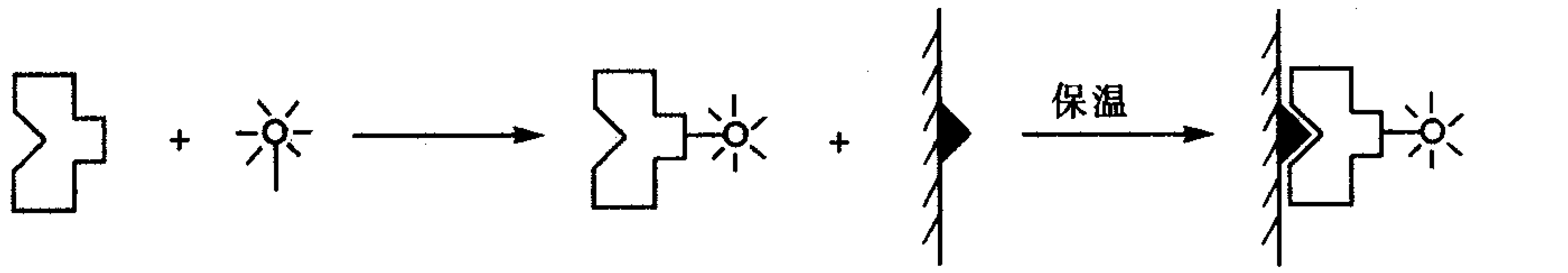


图 13-1　直接法

(二) 检查抗体法

将抗原标记上荧光素,即为荧光抗原。用此荧光抗原与细胞或组织内相应抗体反应,可将抗体定位检测出来。

二、间接法

(一) 检查抗体法(夹心法)

此法是先用特异性抗原与细胞或组织内抗体反应,再用此抗原的特异性荧光抗体与结合在细胞内抗体上的抗原相结合,抗原夹在细胞抗体与荧光抗体之间,故称夹心法。

(二) 检查抗体法

用已知抗原细胞或组织标本的切片,加上待检血清,如果其中含有切片中某种抗原的抗体,抗体便沉淀结合在抗原上,再用间接荧光抗体(抗种属特异性 IgG 荧光抗

体)与结合在抗原上的抗体反应(如检测人血清中的抗体必需用抗人 IgG 荧光抗体等),在荧光显微镜下可见抗原抗体反应部位呈现明亮的特异性荧光。此法是检验血清中自身抗体和多种病原体抗体的重要手段,如图 13-2 所示。

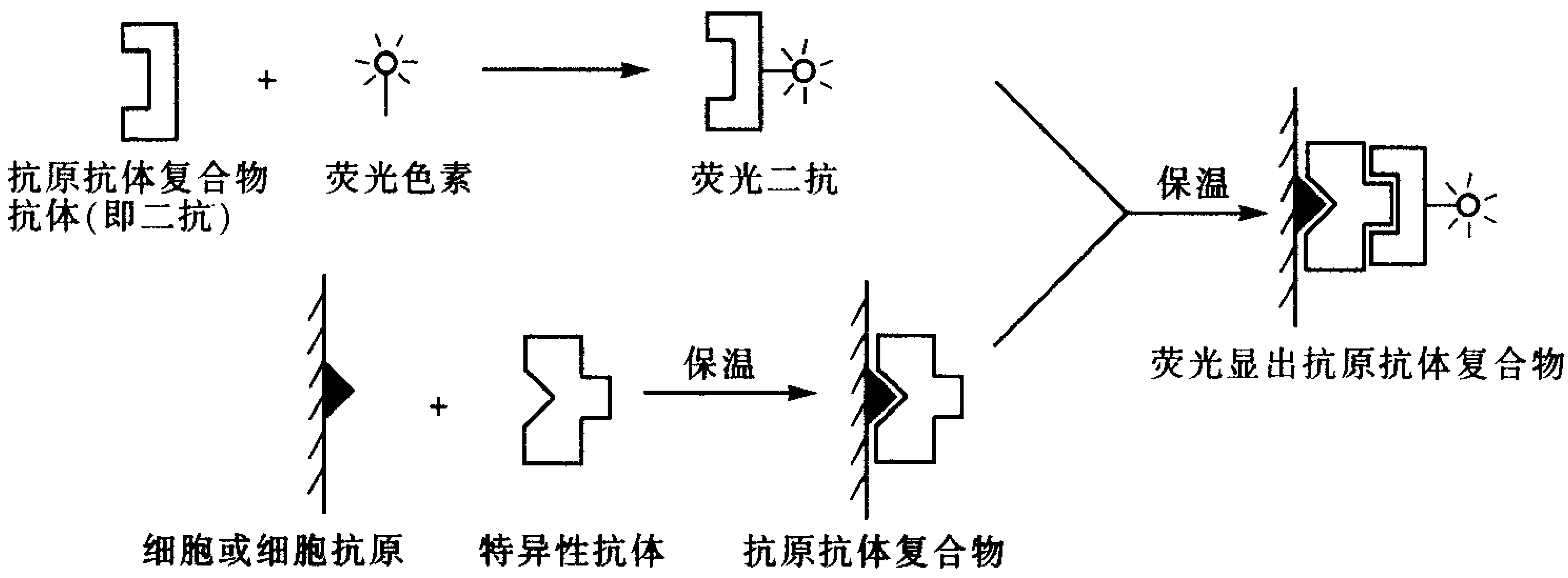


图 13-2　间接法

(三) 检查抗原法

此法是直接法的重要改进,先用特异性(对细胞或组织内抗原)抗体(或称第一抗体)与细胞标本反应,随后用缓冲盐水洗去未与抗原结合的抗体,再用间接荧光抗体(也称第二抗体)与结合在抗原上的抗体(是第二抗体的抗原)结合,形成抗原—抗体—荧光抗体的复合物。由于结合在抗原抗体复合物上的荧光抗体显著多于直接法,从而提高了敏感性。如细胞抗原上每个分子结合 3～5 个分子抗体,当此抗体作为抗原时又可结合 3～5 个分子的荧光抗体,所以和直接法相比,荧光亮度可增强 3～4 倍。此法除灵敏性高外,它只需要制备一种种属间接荧光抗体,可以适用于多种第一抗体的标记显示。这是现在应用最广泛的技术。

三、双重免疫荧光标记法

在同一细胞组织标本上需要同时检查两种抗原时，要进行双重荧光染色，一般均采用直接法，将两种荧光抗体(如抗 A 和抗 B)以适当比例混合，加在标本上孵育后，按直接法洗去未结合的荧光抗体，抗 A 抗体用异硫氰酸荧光素标记，发黄绿色荧光；抗 B 抗体用 TMRITC 或罗丹明标记，发红色荧光，可以明确显示两种抗原的定位。

四、对照试验

为了保证免疫荧光细胞化学染色的准确性,排除某些非特异性染色,必须在初次试验时进行以下对照试验:

(一) 直接法

需设下述对照试验:

(1) 标本自发荧光对照:标本只加 PBS 或不加 PBS,缓冲甘油封片,荧光显微镜观察应呈阴性荧光(无与特异性荧光相似的荧光)。

(2) 抑制试验:可分为二步法和一步法。

二步抑制法:标本先加未标记的特异性抗体,再加标记荧光抗体,结果应呈阴性或明显减弱的荧光。

一步抑制法:先将荧光抗体用未标记抗体做适量混合,再加在标本上染色,结果应为阴性。此法效果较二步法好,并且简便。

(3) 阳性对照:用已知阳性标本做直接法免疫荧光染色,结果应呈阳性荧光。

如对照(1)和(2)无荧光或弱荧光,(3)和待检查标本呈强荧光即为特异性阳性荧光。

(二) 间接法

(1) 自发荧光对照:同直接法。

(2) 荧光抗体对照:标本只加间接荧光抗体染色,结果阴性。

(3) 抑制试验:同直接法。

(4) 阳性对照:同直接法。

如对照(1)、(2)、(3)均呈阴性,阳性对照和待检标本阳性则为特异性荧光。

第三节 荧光抗体的制备

荧光抗体是免疫荧光细胞化学的重要技术之一,制备高特异性和高效价的荧光抗体必须选用高质量的荧光素和高特异性、高效价的免疫血清。

因现在实验室使用的荧光抗体大多可直接从各生物抗体试剂公司购得,既方便快捷,又标准规范,所以我们在这里只介绍最常用的 FITC 标记抗体的方法。

一、FITC 标记抗体的方法

(一) FITC 的特性

异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)呈黄色、橙黄或褐黄色粉末或结晶,性质稳定,在室温下能保存两年以上,在低温中可保存多年。易溶于水和酒精。最大吸收光谱为 490～495nm,最大发射光谱为 520～530 nm,如图 13-3 所示,呈现黄绿色荧光,分子量为 398.4。

在碱性条件下,FITC 的异硫氰酸基在水溶液中与免疫球蛋白的自由氨基经碳酰胺化而形成硫碳氨基键,成为标记荧光免疫球蛋白,即荧光抗体。反应式如图13-4

所示，一个 Ig 分子上最多能标记 15～20 个 FITC 分子。

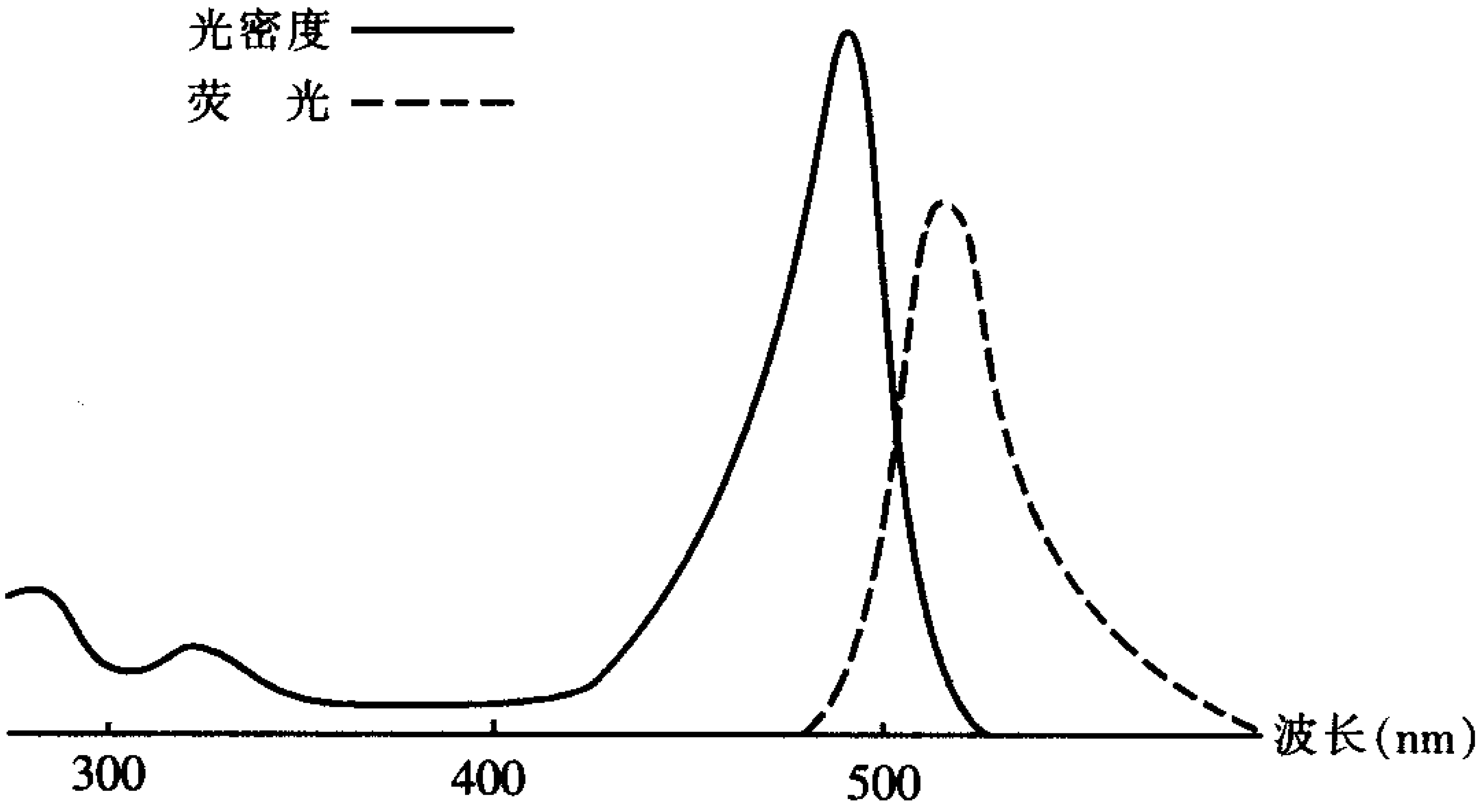


图 13-3　FITC 的吸收光谱和发射光谱

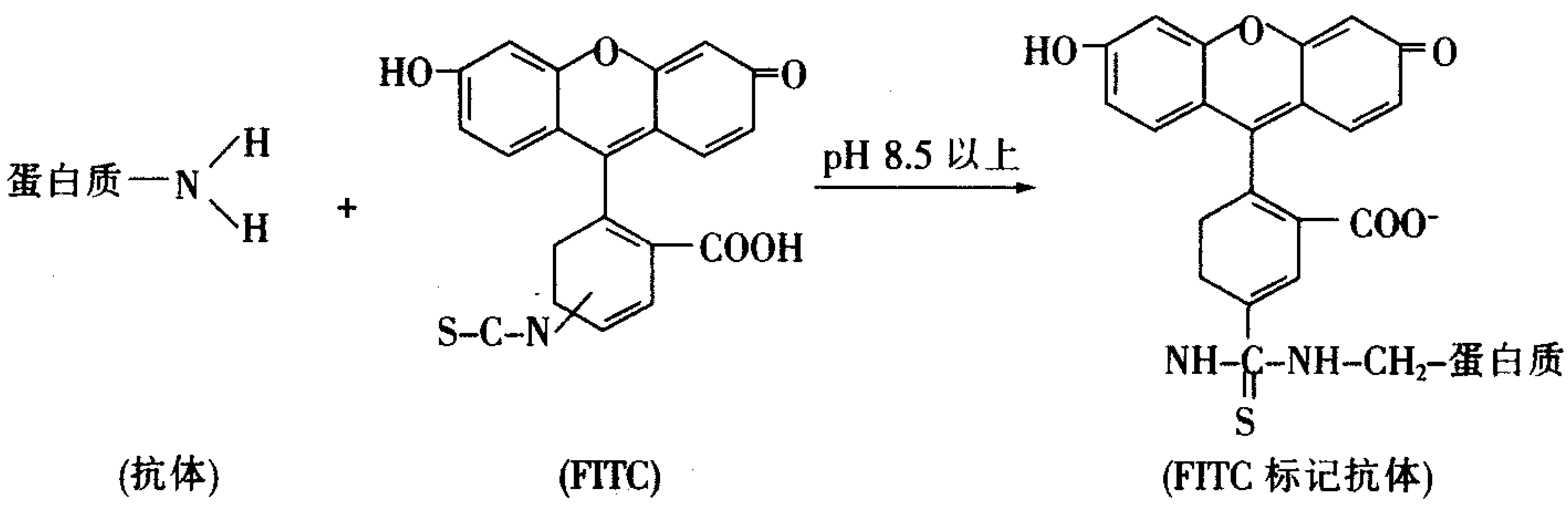


图 13-4　抗体的 FITC 标记反应式

（二）FITC 标记抗体的方法

FITC 标记抗体的方法为 Marsshall 法，其材料和方法及步骤如下：

(1) 材料：抗体球蛋白溶液、0.5mol/L pH 9.0 碳酸盐缓冲液、无菌生理盐水、异硫氰酸荧光素、1%硫柳汞水溶液、三角烧瓶(25～50mL)、冰及冰槽(或 1 000mL 烧杯)、电磁搅拌器、灭菌吸管、透吸袋、玻棒、棉线及烧杯(500mL)、pH 7.2或pH 8.0的 0.01mol/L PBS 等。

(2) 方法及步骤：

抗体的准备：取适量已知球蛋白浓度的溶液，置入三角烧瓶中，加入生理盐水及碳酸盐缓冲液，使最后蛋白浓度为 20mg/mL，缓冲液容量为总量的 1/10，混匀，将三角烧瓶置冰槽中，电磁搅拌(速度适当以不起泡沫为宜)5～10min。

荧光素的准备：根据欲标记的蛋白总量，按每毫克蛋白加 0.01mg 荧光素，用分析天平准确称取所需的异硫氰酸荧光素粉末。

结合(或称标记)：边搅拌边将称取的荧光色素渐渐加入球蛋白溶液中，避免将荧光素粘于三角烧瓶壁或搅拌玻璃棒上(大约 5～10min 内加完)。加毕后，继续搅拌

12～18h。结合期间应保持蛋白溶液于4℃冰箱或冰库中。

透析：结合完毕后，将球蛋白的溶液离心（2 500rpm）20min，除去其中少量的沉淀物，装入透吸袋中后再置于烧杯中，用pH 8.0缓冲盐水透析（0～4℃）过夜。

过柱：取透析过夜的标记物，过葡聚糖凝胶G-25或G-50柱，分装、贮存于4℃冰箱或冰库中。

二、荧光抗体的保存

以0～4℃或－20℃低温保存，防止抗体活性降低和蛋白变性。最好加入浓度为（1∶5 000）～（1∶10 000）的硫柳汞或（1∶1 000）～（1∶5 000）的叠氮钠防腐，小量分装如0.1～1mL，真空干燥后更易长期保存。

第四节　免疫荧光组织化学细胞和组织标本的制备

免疫荧光组织（细胞）化学技术是采用荧光素标记抗体来检测细胞和组织内的相应抗原。抗原的准确显示和定位与制备的细胞和组织标本质量的好坏有着密切的联系。由于各种抗原的生化、物理性质不同，温度高低、酸碱度强弱及各种化学试剂的作用等均可影响抗原的免疫学活性，良好的细胞和组织学结构将有助于抗原的准确定位。因此，细胞和组织标本的采集制备在免疫荧光组织化学技术中占有十分重要的位置。

一、组织标本的取材

近年来，随着荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜的应用和逐步普及，免疫荧光组织化学技术发挥越来越重要的作用。采用培养细胞进行研究已是常用的手段，因此对细胞标本的取材也提出了相应的要求。细胞、组织标本的取材的方法如下：

1. 细胞培养片

培养细胞标本的取材可根据培养的细胞特性分别采取不同的方法。某些细胞有贴壁生长的特性，如成纤维细胞、粘液癌细胞等，只需将载玻片或盖玻片插入培养液内即可收集到理想的细胞标本；某些细胞只能在培养液中生长，可用体液沉淀离心涂片法处理。

制备细胞涂片应注意：

（1）标本反复离心洗涤会造成细胞的粘附性降低，在免疫组化染色过程中容易脱片，因此在制备涂片前载玻片上应涂粘附剂；

（2）为节省试剂和便于镜下观察和计数，应将细胞集中到直径0.6～1.0cm的圆

圈内，细胞总数以 10^5 个左右为宜。

2. 印片法

主要应用于活组织检查标本和手术切除标本。新鲜标本以最大面积剖开，充分暴露病变区，将载玻片轻轻压于病变区，脱落的细胞便粘附在玻片上，立即浸入细胞固定液内 5～10min，取出后自然干燥，低温保存备用。

该方法优点是简便省时，细胞抗原保存较好；缺点是细胞分布不均匀，玻片上细胞重叠，影响标记效果。

3. 组织切片的取材

组织切片标本主要包括活检标本、动物模型标本等。

组织切片标本的取材常常受到各种因素的影响，如过度挤压而变形，造成组织结构被破坏。因此取材的器械必须锋利，以免组织受挤压。

为充分保存组织的抗原性，标本离体后应立即用固定液固定处理，或立即速冻成冻块进行冰冻切片，如不能迅速制片，可贮存于液氮罐内或－70℃冰箱内备用。

二、细胞和组织的固定

（一）固定的目的

免疫组化与其他组织学技术不同，除要求保存良好的结构外，还需保存组织抗原的免疫活性。不同抗原，其稳定性也不相同，因而对固定剂的耐受性差异较大。若想得到理想的免疫组化染色结果、正确地判断抗原物质在组织细胞内的位置，除需有良好酶和抗体外，保持组织细胞内抗原物质的原位不动和免疫活性是至关重要的。如果抗原物质在组织细胞间弥散、丢失或失去免疫活性，无论如何努力，染色效果都不会很好，所以说固定是免疫组化染色中非常重要的一环。

一般认为，新鲜组织能够最大限度地保存组织抗原的免疫活性，但结构较差，易出现抗原弥散丢失现象。据报道，不固定的组织切片免疫组化染色时，环鸟苷酸含量丢失 80%以上。

固定的目的是使构成组织细胞成分的蛋白等物质不溶于水和有机溶剂，并迅速使组织细胞中各种酶降解、失活，防止组织自溶和抗原弥散，保持组织细胞的完整性和所要检测物质的抗原性。因此，迅速、充分固定是免疫组化染色成功的关键一步。用于免疫组化的固定剂种类较多，应根据所要检测物质的抗原性质和切片方法以及所用抗体特征等做最佳筛选。

（二）固定剂

用于免疫组织化学的固定剂种类较多，性能各异，在固定半稳定性抗原时，尤其重视固定剂的选择，简介如下，其他固定剂及其配制方法可参阅相关文献。

1. 醛类固定剂

为双功能交联剂，其作用是使组织之间相互交联，保存抗原于原位，其特点是对

组织穿透性强,收缩性小。有人认为它对IgM、IgA、J链、K链和λ链的标记效果良好,背景清晰,是常用的固定剂。

(1) 10% 钙-甲醛液,配方:浓甲醛 10mL,饱和碳酸钙 90mL。

(2) 10%中性缓冲甲醛液,配方:浓甲醛 10mL,0.01mol/L pH 7.4 PBS 90mL。

(3) 4%多聚甲醛磷酸缓冲浪(pH 7.4),配方:多聚甲醛 40g,0.1mol/L 的 PBS 液(pH 7.4)500mL,两者混合加热至 60℃,搅拌并滴加 1mol/L NaOH 至清晰为止,冷却后加 PBS 液至总量 1 000mL。

(4) 戊二醛-甲醛液,配方:戊二醛 1mL,浓甲醛 10mL,蒸馏水加至 100mL。

戊二醛是二醛基化合物,交联结合力比甲醛大。Bullock 认为,交联过强可出现组织改变和空间遮蔽现象,影响组织的抗原性;但 McDonald 等认为,该试剂用于PAP 法免疫酶标记效果仍满意。

(5) Zamboni 液,该固定液可用于电镜免疫细胞化学,对超微结构的保存优于纯甲醛,也适用于光镜免疫细胞化学研究。采用 2.5%多聚甲醛和 30%饱和苦味酸,更可增加对组织穿透力和固定效果,以保存更多的组织抗原,固定时间为 6～18h。此固定液虽然保存抗原较好,但苦味酸能自发荧光,故宜用于免疫组化,不宜用于免疫荧光组化。

2. 丙酮及醇类固定剂

丙酮及醇类固定剂是最初免疫细胞化学染色的固定剂,其作用是沉淀蛋白质和糖,对组织穿透性很强,保存抗原的免疫活性较好。但醇类对低分子蛋白质、多肽及胞浆内蛋白质保存效果较差,解决的办法是和其他试剂混合使用,如加冰醋酸、乙醚、氯仿、甲醛等。

(1) Clarke 氏改良剂,配方:100%酒精 95mL,冰醋酸 5mL,用于冰冻切片的后固定。

(2) AAF 液,配方:95%～100%酒精 85mL,冰醋酸 5mL,浓甲醛 10mL。

(3) Methacarn 液,配方:甲醇 60mL,氯仿 30mL,冰醋酸 10mL,混合后 4℃保存备用。

以上固定液适宜某些抗原、癌基因蛋白产物检测的固定,P53 抗癌基因蛋白产物、PC-NA 等抗原的保存。

丙酮的组织穿透性和脱水性更强,常用于冰冻切片及细胞涂片的后固定,保存抗原性较好,平时 4℃低温保存备用,临用时只需将涂片或冰冻切片插入冷丙酮内 5～10min,取出后自然干燥,贮存于低温冰箱备用。

以上介绍了免疫组织化学中常用的固定液,用于免疫组化的固定剂种类很多(见附录),不同的抗原和标本需经过反复试验,选用最佳固定液。不少学者认为,迄今尚无一种标准固定液可以用于各种不同的抗原固定。而且同一固定液固定的组织,免疫组化染色标记结果可能截然不同,致使人们无所适从。

最理想的固定液标准是:最好地保持细胞和组织的形态结构,最大限度地保存抗

原的免疫活性。

一些含重金属的固定液在免疫组化技术中是禁用的。实际经验告诉我们,中性缓冲甲醛液(或多聚甲醛)是适应性较广泛的固定液,但固定时间不宜过长。必要时,可用多种固定液做对比,从而选出理想的标准固定液。

固定组织时应注意:

(1) 应力求保持组织新鲜,勿使其干燥,尽快固定处理;

(2) 组织块不宜过大过厚,必须小于 2cm×1.5cm×0.3cm,尤其是组织块厚度必须控制在 0.3cm 以内;

(3) 固定液必须有足够的量,在体积上一般大于组织 20 倍以上,否则组织中心固定不良影响效果;

(4) 组织固定后应充分水洗,去除固定液造成的人为假象。

(三) 固定方法

1. 浸泡法

将组织浸泡在固定液内,必要时可在低温(4℃)环境下进行,固定时间可根据抗原的稳定性以及固定液性质而定,一般在 2～12h 之间。

浸泡法主要用于活检和手术标本,以及其他不能进行灌注的组织固定。

2. 灌注法

此法适用于动物实验研究。自左心室插入主动脉,先以生理盐水冲洗血液后,以泵、吊筒或 50～100mL 注射器注入固定液。一般在灌注后 30min 内取材,取组织置同一固定剂中浸入 1～3h,然后修整组织块。光镜下观察的标本,室温固定和冷固定剂(4℃)进行灌注都可获得满意效果,但应注意保持组织新鲜很重要。据报告,肽类抗原活性在断绝血液供应后 24h 几乎完全丧失。灌注法固定可使固定液迅速达到全身各组织,达到充分固定的目的。灌注冲洗还能排除红细胞内假过氧化物酶的干扰。

3. AMEX(acetone meth enzoate xylene)

此法是改良的冰冻置换法(freeze substitution)的简称,主要用于石蜡包埋标本。Sato(1986)报道,该法具有同新鲜(未固定)组织冰冻切片同样的抗原保持性和石蜡切片的良好组织结构保存,其机制为:组织在丙酮中固定(脱水),组织细胞内水分逐渐被丙酮取代,继而用苯甲酸酯取代组织内丙酮,经二甲苯置换后石蜡包埋。组织在－20℃丙酮内过夜亦形成冰晶,所以原方法将组织先置 4℃丙酮 20～30min,再移入－20℃丙酮过夜,实际上组织在 4℃丙酮内过夜亦可得到同样效果。如在该固定液内加入少量蛋白酶活性阻断剂,并采用低熔点石蜡包埋等,可获得更佳染色结果。

4. 微波固定

该方法近几年备受关注,它能保持良好的组织结构和抗原性,适于各种切片的酶组化、免疫组织化学,以及免疫电镜等材料固定。其固定机制可能与微波(频率 1 000～3 000MHz)具有被水分吸收的性质(通常所用的微波频率是 2 450MHz,波长

是 12cm)；生物材料含有大量水分，照射后，温度升高，分子运动加快，促进固定液向组织内渗透，加速与组织成分的反应，短时间内达到固定的效果等有关。经微波照射固定的组织，需置相同固定液中，继续室温固定 2～6h。专门用于微波固定的微波炉已商品化，例如：Bio-Rad H2500 型、日新 EM·MWE-2 等，该类微波炉能够准确地调节照射时间和测定被照材料的瞬时温度。利用家用微波炉代替时，应选用能以秒为单位调控的微波炉。实验材料不同，所需固定液的量、照射时间等各异，所以应在预实验的基础上，找出合适的固定液量、照射时间和温度。多数实验室的条件为：固定液 5～10mL，照射 10～30s，照射后固定液的温度 ≤50℃。微波固定的方法为：将实验标本置于微波炉旋转台的中央，周边放一烧杯盛 300～500mL 纯水，吸收照射时炉内产生的热量，选择强档照射 10～30s。接通电源至微波产生，利用超声波代替微波照射或二者并用。照射后，组织标本和固定液的温度升高较少，亦能获得短时间内良好的固定效果。微波炉照射的切片，能够激活部分核内抗原活性，其机制不清，可能与高温、高热作用使核内 DNA 双链解开，DNA、RNA 解离，抗原暴露有关。将切片脱蜡水洗后，置染色瓶中，加入去离子水或缓冲液至瓶颈处，反复多次照射，每次 1min，照射 5～10 次，每次照射后，补充瓶中蒸发掉的液体，照射温度不超过 90～95℃为宜。此处理后，细胞核染色以苏木精为佳。

三、组织切片

应用于光镜的免疫组织化学染色的切片厚度一般要求 5μm 左右，神经组织的研究要求切片厚度在 20～100μm，有利于追踪神经纤维的走行。

（一）冰冻切片

冰冻切片是免疫组织化学染色中最常用的一种切片方法。其最突出的优点是能够较完好地保存多种抗原的免疫活性，尤其是细胞表面抗原更应采用冰冻切片。新鲜的组织及已固定的组织均可作冰冻切片。

冰冻时，组织中水分易形成冰晶，往往影响抗原定位。一般认为冰晶大而少时，影响较小，冰晶小而多时，对组织结构损害较大，在含水量较多的组织中上述现象更易发生。冰晶的大小与其生长速率成正比，而与成核率(形成速率)成反比，即冰晶形成的数量愈多则愈小，对组织结构影响愈严重。因此，应尽量降低冰晶的数量。Fish 认为冰冻开始时，冰晶成核率较慢，以后逐渐增加，其临界温度为－33℃，从－30℃降至－43℃之间，成核率急剧增加，然后再减慢。基于上述理论可采取以下措施减少冰晶的形成。

1. 速冻

使组织温度骤降，缩短从－33℃到－43℃的时间，减少冰晶的形成。方法包括：

(1) 干冰-丙酮(酒精)法。将 150～200mL 丙酮(酒精)装入小保温杯内，逐渐加入干冰，直至饱和呈粘稠状，再加干冰不再冒泡时，温度可达－70℃，用一小烧杯

(50～100mL)内装异戊烷约 50mL，再将烧杯缓慢置入干冰丙酮(或纯酒精)饱和液内，至异戊烷温度－70℃时即可使用。将组织(大小为 1cm×0.8cm×0.5cm)投入异戊烷内速冻 30～60s 后取出，或置恒冷箱内以备切片，或置－80℃低温冰箱内贮存。

(2) 液氮法。将组织块平放于软塑瓶盖或特制小盒内(直径约 2cm)，如组织块小，可适量加 OCT 包埋剂浸没组织，然后将特制小盒缓缓平放入盛有液氮的小杯内，当盒底部接触液氮时即开始气化沸腾，此时小盒保持原位切勿浸入液氮中，大约 10～20s 后组织即迅速冰结成块。取出组织冰块立即置入－80℃冰箱贮存备用或置入恒冷箱切片机冰冻切片。

2. 蔗糖溶液应用

将组织置于 20%～30%蔗糖溶液 1～3 天，利用高渗吸收组织中水分，减少组织含水量。

3. 冰冻切片机

影响冰冻切片的因素较多，因此，技术难度较大，选择好的冰冻切片机是保证切片质量的关键。目前冰冻切片机有两类：

(1) 恒冷箱冰冻切片机。此种切片机型号很多，Lecai 1900 恒冷箱切片机为较理想的冰冻切片机。其基本结构是将切片机置于－20℃低温密闭室内，故切片时不受外界温度和环境影响，可连续切薄片至 3～5μm，完全能满足免疫荧光组织化学标记要求。切片时，恒冷箱内温度设置为－20℃，样品头的温度设置为－22℃，若温度过低组织易破碎。切片刀上的反卷板的位置及角度要调节适当。用载玻片附贴组织切片时，勿上下移动。

(2) 开放式冰冻切片机。包括半导体制冷切片机和甲醇制冷切片，以及老式的 CO_2、氯乙烷等冷冻切片机。切片时暴露空气中，温度不易控制，切片技术难度大，在高温季节，切片更加困难，且切片厚达 8～15μm，不易连续切片，但其优点是价廉，国内有生产。

如新鲜组织在冰冻切片前未进行固定，在冰冻切片后应使用相应的固定剂固定 10min，电风扇吹干后再进行免疫学实验或－20℃保存。

冰冻切片后如不染色，必须用电风扇吹干，贮存于－70℃低温冰箱内或进行短暂预固定后贮存冰箱保存。

(二) 石蜡切片

石蜡切片的优点是组织结构保存良好，能切连续薄片，组织结构清晰，抗原定位准确。用于免疫荧光组化技术的石蜡切片制备与常规制片略有不同：

(1) 脱水、透明等过程应在 4℃下进行，以尽量减少组织抗原的损失；

(2) 组织块大小应限于 2cm×1.5cm×0.2cm，使组织充分脱水、透明、浸蜡；

(3) 浸蜡、包埋过程中，石蜡应保持在 60℃。

组织块脱水、透明、浸蜡时间：70%乙醇，4℃，3～4h → 80%乙醇，4℃，3～4h → 90%乙醇，4℃，2～3h → 95%乙醇 Ⅰ，4℃，2～3h → 95%乙醇 Ⅱ，4℃，1～2h →

100%乙醇Ⅰ,4℃,1.5h → 100%乙醇Ⅱ,4℃,1.5h → 二甲苯Ⅰ,4℃,0.5～1h →二甲苯Ⅱ,4℃,0.5～1h → 石蜡Ⅰ,60℃,1h → 石蜡Ⅱ,60℃,2h。

以上全过程为18～24h,也可在室温内使用自动脱水机代替。如组织块小,直径小于0.5cm,可用快速石蜡包埋切片,全过程只需4h左右。

石蜡切片为常规制片技术,切片机多为轮转式,切片厚度3～7μm,应用范围广,不影响抗体的穿透性,染色均匀一致。由于甲醛固定、有机溶剂和包埋剂对抗原有一定的损害及遮蔽,使抗原特征发生改变。有人报道经蛋白酶消化,可以改善光镜免疫组化染色强度,常用的有胰蛋白酶、链霉蛋白酶及胃蛋白酶等消化法。石蜡切片应在37℃恒温箱过夜,这样可使切片紧密贴在载玻片上,可减少染色中脱片现象。切片如需长期贮存,可存放于4℃冰箱内备用。

石蜡切片优点较多,但在制片过程中要经过酒精、二甲苯等有机溶剂处理,组织内抗原活性失去较多,有人采用冷冻干燥包埋法(freeze drying embedding methed),可以保存组织内可溶性物质,防止蛋白变性和酶的失活,从而减少抗原的丢失。该法是将新鲜组织低温速冻,利用冷冻干燥机(freezingdryer)在真空、低温条件下排除组织内水分,然后用甲醛蒸气固定干燥的组织,最后将组织浸蜡、包埋、切片。此法可用于免疫荧光标记、免疫酶标记及放射自显影。

(三) 振动切片

用振动切片机(Vibratotme),可以把新鲜组织(不固定不冰冻)切成厚片(20～400μm),以漂浮法在反应板进行免疫荧光组织化学染色,然后在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下检出免疫反应阳性部位。振动切片也可修整后进行后固定,按电镜样品制备、脱水、包埋、超薄切片、染色观察等。组织不冰冻,无冰晶形成和组织抗原破坏,在免疫组化染色前避免了组织脱水、透明、包埋等步骤对抗原的损害,能较好地保留组织内脂溶性物质和细胞膜抗原,主要用于显示神经系统抗原分布研究。这种包埋前染色,尤其适用于免疫电镜观察。

四、玻片处理和涂胶

在免疫组化染色过程中,由于各种原因常造成标本(细胞制片和组织切片)脱片现象,影响了工作质量和速度。一般采取两种方法即可防止脱片现象出现。

(一) 载玻片和盖玻片处理

新载玻片上有油污,必须经过清洁液浸泡12～24h,流水充分漂洗后用蒸馏水清洗3遍以上,浸泡在95%酒精内2h,用绸布擦干或用红外线烤箱烤干均可,贮放于玻片盒内备用。盖玻片很薄,以上处理程序必须缩短,清洁液浸泡只需2h,流水冲洗注意勿损伤玻片等。

(二) 载玻片上涂粘附剂

粘附剂种类较多,常用的有以下几种:

(1) 树脂胶(resin glue)又称白乳胶，为木工用，有进口、国产之分，有人认为进口白色树脂胶较稳定，也有人认为国产白乳胶(聚醋酸乙烯乳液J-北京产)质量尚稳定。使用浓度为1%～2%，以蒸馏水稀释即可；

(2) 甘油明胶，混匀后涂在载玻片上，切片贴附后置有副醛的干燥器内，80℃加热1h；

(3) 甲醛明胶，混合后即可涂片；

(4) 铬明矾明胶，混合后即可涂片，37℃温箱烤干；

(5) 多聚赖氨酸液：多聚赖氨酸0.1g，加蒸馏水10mL，混合后即可涂片。此液不宜多配制；

(6) 3-amino propy eriethoxy silame(APES)。

粘附剂甘油明胶、甲醛明胶、铬明矾明胶、多聚赖氨酸液的配制法见附录。

第五节　免疫荧光细胞化学染色方法

一、标本制作

将上述细胞培养片或组织切片，经适当处理后，作免疫荧光染色用。

二、荧光抗体染色方法

(一) 直接法

1. 染色

切片经固定后，滴加经稀释至染色效价如1∶8或1∶16的荧光抗体(如兔抗人γ-球蛋白荧光抗体或兔抗人IgG或IgA荧光抗体等)，在室温下或37℃染色30min，切片置入能保持潮湿的染色盒内，防止干燥。

2. 洗片

倾去存留的荧光抗体，将切片浸入pH 7.4或pH 7.2 PBS中洗两次，每次5min，再用蒸馏水洗1min，除去盐结晶。

3. 封固

用50%缓冲(0.5mol/L碳酸盐缓冲液pH 9.0～9.5)甘油封固或用抗淬灭剂封固。

4. 用荧光显微镜检测

5. 对照染色

(1) 正常免疫荧光血清染色，如上法处理切片，结果应为阴性。

(2) 染色抑制试验(一步法):将荧光抗体和未标记的抗体球蛋白或血清(相同)等量混合,如上法处理切片,结果应为阴性。为证明此种染色抑制不是由于荧光抗体被稀释所致,可用盐水代替未标记抗血清,染色结果应为阴性。此法结果较二步法稳定。

直接法比较简单,适合做细菌、螺旋体、原虫、真菌及浓度较高的蛋白质抗原如肾、皮肤的检查和研究。此法每种荧光抗体只能检查一种相应的抗原,特异性高而敏感性较低。

(二) 间接法

(1) 切片固定后用毛细滴管吸取经适当稀释的免疫血清滴加在其上,置于染色盒中保持一定的湿度,37℃作用 30min。然后用 0.01mol/L pH 7.2 PBS 洗两次,每次 10min,之后用吸液器吸去液体并吹干余留的液体。

(2) 再滴加间接荧光抗体(如兔抗人 γ-球蛋白荧光抗体等),同上步骤,染色 30min,37℃,用 PBS 洗两次,每次 10min,缓冲甘油封固,镜检。

间接法的对照染色:①抗体对照:用正常兔血清或人血清代替免疫血清,再用上法进行染色,结果应为阴性。②抗原对照:即类属抗原染色,亦应为阴性。③阳性对照。

上述方法称双层法(Double Layer Method),是间接法的一种。另一种称夹心法,即用未标记的特异性抗原加在切片上先与组织中之相应抗体结合,再用该抗原的荧光抗体重叠结合其上,而间接地显示出组织和细胞中抗体的存在,方法及步骤如下:

(1) 切片或涂片固定后,置于染色湿盒内;

(2) 滴加未标记的特异性抗原作用切片于 37℃,30min;

(3) 用 PBS 洗两次,每次 5min,吹干;

(4) 滴加特异性荧光抗体作用切片于 37℃,30min;

(5) 同步骤(3);

(6) 缓冲甘油封固或用抗淬灭剂封固;

(7) 荧光显微镜检测。

间接法只需制备一种荧光抗体可以检出多种抗原,敏感性较高,操作方法较易掌握,而且能解决一些不易制备动物免疫血清的病原体(如麻疹)等的研究和检查,所以已被广泛应用于自身抗体和感染病人血清的试验。

(三) 双重染色法

在同一标本上有两个抗原需要同时显示(如 A 抗原和 B 抗原),A 抗原的抗体用 FITC 标记,B 抗原的抗体用罗丹明标记,可采用以下染色方法:

1. 一步法双染色

先将两种标记抗体按适当比例混合(A+B),按直接法进行染色。

2. 二步法双染色

先用RB200标记的B抗体染色，不必洗去，再用FITC标记的A抗体染色，按间接法进行。

结果：A抗原阳性荧光呈现绿色，B抗原阳性呈现橙红色荧光。

（四）膜抗原荧光抗体染色法

本法应用直接法或间接法的原理和步骤，可对活细胞在试管内进行染色，常用于T和B细胞、细胞培养物、瘤细胞抗原和受体等的检查和研究，阳性荧光主要在细胞膜上。FACS即采用此法原理。

（五）补体法

1. 材料

（1）免疫血清60℃灭活20min，用Kolmers盐水作2倍稀释成1∶2，1∶4，1∶8，…补体用1∶10稀释的新鲜豚鼠血清，抗补体荧光抗体等，按下述的补体法染色。免疫血清补体结合的效价，如为1∶32则免疫血清应作1∶8稀释；

（2）补体用新鲜豚鼠血清一般作1∶10稀释或按补体结合反应试管法所测定的结果，按2单位的比例，用Kolmers盐水稀释备用。Kolmers盐水配法：在pH 7.4，0.1mol/L的磷酸缓冲盐水中溶解$MgSO_4$，含量为0.01%；

（3）抗补体荧光抗体：在免疫血清效价为1∶4，补体为2单位的条件下，用补体染色法测定免疫豚鼠球蛋白荧光抗体的染色效价，然后按染色效价1∶4的浓度用Kolmers盐水稀释备用。

2. 方法及步骤

（1）涂片或切片固定；

（2）吸取经适当稀释后的免疫血清及补体的等量混合液（此时免疫血清及补体又都稀释一倍）滴于切片上，37℃作用30min，置于保持一定湿度的染色盒内；

（3）用PBS洗两次，每次5min，吸干标本周围水液；

（4）滴加经过适当稀释后的抗补体荧光抗体30min，37℃，水洗同(3)；

（5）蒸馏水洗1min，缓冲甘油封固。

3. 对照染色

（1）抗原对照；

（2）抗血清对照：用正常兔血清代替免疫血清；

（3）灭活补体对照：将补体经56℃ 30min处理后，按补体同样比例稀释，与免疫血清等量混合后，进行补体法染色。

本法的荧光抗体不受免疫血清的动物种属的限制，因而一种荧光抗体可作更广泛的应用，敏感性亦较间接法高，效价低的免疫血清亦可应用，节省免疫血清，尤其是在检查形态小的立克次氏体、病毒颗粒等或浓度较低的抗原物质时甚为理想。

（六）荧光抗体再染色法

若切片或其他标本经某种荧光抗体染色后，未获得阳性结果，而又疑有另外的病

原体存在时，可用相应的荧光抗体再染色。

有时存档蜡块不能再用以切片，也可用存档的 HE 染色标本，褪去盖片和颜色，再做免疫荧光或其他免疫细胞化学的染色。

第六节　非特异性染色的消除方法

一、非特异性染色的主要因素

组织的非特异性染色的机制很复杂，其产生的原因主要可分为以下几点：

(1) 一部分荧光素未与蛋白质结合，形成了聚合物和衍化物，而不能被透析除去。

(2) 抗体以外的血清蛋白与荧光素结合形成荧光素脲蛋白，可与组织成分结合。

(3) 除去检查的抗原以外，组织中还可能存在类属抗原(如 Forssman 氏抗原)，可与组织中特异性抗原以外的相应抗体结合。

(4) 从组织中难于提纯抗原性物质，所以制备的免疫血清中往往混杂一些抗其他组织成分的抗体，以致容易混淆。

(5) 抗体分子上标记的荧光素分子太多，这种过量标记的抗体分子带过多的阴离子，可吸附于正常组织上而呈现非特异性染色。

(6) 荧光素不纯，标本固定不当等。

二、除非特异性染色的方法

消除荧光抗体非特异性染色的方法应根据产生的原因采取适当的方法，常用的方法有以下几种：

(一) 动物脏器粉末吸收法

常用肝粉(猪、大白鼠或小白鼠肝粉)，其次是骨髓粉、鼠脑粉和鸡胚粉等。每毫升荧光抗体中加入肝粉 50～100mg，在离心管中充分混匀，在室温中振动 2h，4℃中过夜，再搅拌 10min，高速离心(3 000～15 000rpm)30min，1～2 次后，即可使用其上清液。吸收一般应在临用前进行，吸收后的荧光抗体保存在冰箱中勿超过两周。染色应作吸收前后的比较，吸收时可先用缓冲盐水将组织干粉浸湿，离心(3 000～15 000rpm)30min，除去上清液，再加入荧光抗体进行吸收，以免消耗过多的抗体。

肝粉或新鲜细胞吸收是一种非特异性的消除方法，对荧光抗体的荧光色素和蛋白都有吸附作用。如检查组织中的病毒抗原时，也可用相同的组织干粉或匀浆沉淀物吸收。

用脏器肝粉吸收对荧光抗体损失较多，如果根据 Hiramotos 氏等的方法将组织

的20%生理盐水匀浆液，用生理盐水洗2～3次，12 000rpm 10min离心沉淀，用其沉淀物吸收其荧光抗体即能完全达到目的，有学者认为这样吸收对荧光抗体几乎没有损失，他们常用此法，效果甚佳，吸收后放置一周左右，用时有必要再吸收一次。

肝粉的制法：

(1) 将若干只小白鼠或大白鼠放血杀死，取出肝脏，用生理盐水洗2～3次，除去血液，剥掉表面的结缔组织和脂肪。

(2) 剪碎，用生理盐水反复洗涤至无血色为止，然后再加生理盐水少许，用组织捣碎机或匀浆器打成匀浆。

(3) 将肝匀浆装入离心管内(1/3左右)，交换地用2～3倍量生理盐水和丙酮反复洗涤各3次，至上清无血色为止，每次完毕先用2 000rpm离心沉淀15min后，再除去上清液。

(4) 最后用丙酮洗涤肝浆，再用布氏漏斗过滤或离心沉淀，将沉淀物平铺在洁净的玻璃板上，37℃烤干(过夜)。

(5) 在研钵中充分研磨，用120目铜筛筛选过后，分装，密封，低温干燥保存。

(二) 透析法

荧光素如FITC分子可以通过半透膜，而蛋白质大分子不能透过，可将未与蛋白结合的荧光素透析除去。步骤如下：

(1) 将标记完毕的荧光蛋白液装入一透析袋或玻璃纸袋内，液面稍留空隙，扎紧。

(2) 浸入0.02mol/L pH 7.1～7.4的PBS中(悬浮于大于标记物体积约50～100倍的PBS内)，在4℃中透析，每日更换3～4次PBS，透析约5～7天，直到透析液中无荧光素方可(在荧光光源照射下)。

(三) 葡聚糖凝胶G-50柱层析法

去除游离荧光素可用2cm×46cm柱层析法。加入荧光抗体15～18mL(按床体积的5%～10%加样)，使其缓慢渗入柱内，待即将全部入柱时，加入PBS少许，关闭下口，停留30～40min，使游离荧光充分进入细筛孔中，然后再接通洗脱瓶开始滴入洗脱液。加入洗脱液一定量后，荧光抗体即向下移行，逐渐与存留于上端的游离荧光素之间拉开明显的界线，随着大量洗脱液的不断加入，二者分离距离越来越大，荧光抗体最先流出，分前、中、后三部分收集，测F/P比值，合格者合并、浓缩、分装。洗脱液用20%磺基水杨酸测定蛋白(发生沉淀反应)，继续洗脱，游离荧光素则相继被洗脱下来，至洗脱液中无蛋白和荧光素后，此层析柱可再用。

若用以除去荧光抗体中的游离荧光素和硫酸铵等盐类，可先在过柱前透析一夜，否则NH_4^+太浓，在蛋白未完全洗脱时即出现NH_4^+，因而影响提纯与回收蛋白，一般待洗脱液出现蛋白时，即进行收集，之后出现SO_4^{2-}(用1% $BaCl_2$检查发生白色沉淀)。最后是NH_4^+(用纳氏试剂检查呈黄棕色沉淀)，待洗脱液无SO_4^{2-}及NH_4^+后可再用。

如仅用少量荧光抗体，可用 1cm×20cm 的柱层析柱，取 2g Sephadex G-50 装柱，即可过滤 2～3.5mL 荧光抗体。

（四）DEAE-纤维素柱层析法

标记过多或过少荧光素的抗体分子可用 DEAE-纤维素柱层析法除去。方法如下：DEAE-纤维素柱的装柱，洗脱、再生方法等与提纯 IgG 方法相同；装柱所需 DEAE-纤维素量以干重每克交换 20～50mg 标记蛋白量为宜。常用梯度洗脱法如下：

（1）层析柱用 0.01mol/L pH 7.2 PBS 平衡，标记物上柱后，先用 0.01mol/L pH 7.2 PBS 洗脱，洗出无色或淡绿色液体，洗脱液量根据床体积大小每梯度乘 3，然后依下列各种离子强度洗脱液分别洗脱和收集：0.01mol/L pH 7.2 PBS(0.05mol/L NaCl)，这部分为洗脱部分一；0.01mol/L pH 7.2 PBS(0.01mol/L NaCl)，这部分为洗脱部分二；0.01mol/L pH 7.2 PBS(0.02mol/L NaCl)，这部分为洗脱部分三。分别测定此三部分收集液(每管 5mL)F/P 比值，0.05mol/L NaCl pH 7.2 PBS 洗脱液 280nm 光密度高峰管合并，浓缩保存备用。因这部分非特异性染色荧光最少，是比较好的荧光抗体，其他两部分可以废弃。

（2）柱上吸附过多的标记蛋白，可继续增加 NaCl 的浓度至 2.0mol/L 洗脱完。经过 DEAE-纤维素层析后的标记抗体，其抗体量一般约损失 50%，因此有些要求不太高的抗体，如抗细菌荧光抗体，不一定要这样处理，可用染色效价测定的稀释法除去非特异性染色。

（五）荧光抗体稀释法

先测定荧光抗体特异性染色与非特异性染色的效价，若二者效价相差较大，则可将荧光抗体稀释至一临界浓度，使特异性染色呈阳性，而使非特异性染色保持阴性，稀释方法和染色效价测定方法相同。

（六）纯化抗原法

用各种方法提纯单一成分的抗原是产生单价特异性抗体的最主要条件。近代免疫化学技术(免疫吸收法)和柱层析法等提供了很大的可能性，可参考有关专著。

（七）纯化抗体法——免疫吸收法

例如抗 IgA 血清的纯化方法——免疫吸收法。如分泌型 IgA(sIgA)抗原纯度不高，所制的抗血清常与 IgG 呈交叉反应，为此需要吸收纯化，常采用纯化的人 IgG 戊二醛聚合物加以吸收纯化。方法如下：

1. 人 IgG 聚合物的制备

在 5mL 含 40mg/mL 人 IgG 的 0.1mol/L pH 7.0 磷酸缓冲溶液中，加入 2.5% 戊二醛溶液 1mL，边加边搅，5min 即出现混浊，逐现大块胶块，放置 30min 后，用研钵将凝胶磨细，继用 1.0mol/L pH 7.0 磷酸缓冲溶液反复洗涤 3 次，末次加蒸馏水至 20mL，即为人 IgG 聚合物悬液。

2. 免疫吸收法

将待吸收的抗 slgG 血清加入等量 IgG 聚合物悬液，置室温搅拌 60min，离心沉淀，上清液即稀释 1 倍的纯化抗 sIgA 血清。如用 IgG 聚合物做少量分次吸收，其效果更好。

（八）伊文氏蓝(evans blue)衬染法

用 0.01%伊文氏蓝的 0.01mol/L pH 7.2 PBS 稀释荧光抗体，可将背景细胞和组织染色，呈红色荧光，与特异性黄绿色荧光形成鲜明的对比，减少了非特异性荧光。但在进行激光扫描共聚焦显微镜观察时，最好不用，因为在目标荧光进行叠加时有一定影响。伊文氏蓝一般先配成 1%溶液，于 4℃保存，用前再稀释至 0.01%用以稀释荧光抗体。此外，还可以用胰酶消化组织切片或用 10%牛血清蛋白封闭法等消除非特异性染色，提高特异性染色。

第三部分

常用荧光检测仪器

第十四章　生物荧光显微镜

第一节　普通生物光学显微镜

光学显微镜是利用光学原理将人眼所不能分辨的微小物体放大成像，以供人们提取微细结构信息的光学仪器。

早在公元前一世纪，人们就已发现通过球形透明物体去观察微小物体时，可以使其放大成像，后来逐渐对球形玻璃表面能使物体放大成像的规律有了认识。英国的狄更斯(Digges)和荷兰的詹森父子(Hans and Zachrias Janssen)是早期显微镜最著名的开创者；1610 年意大利物理学家伽利略(Galileo)制造出了具有物镜、目镜和镜筒的简单复式显微镜；1611 年开普勒(Kepler)阐明了显微镜的基本原理；1628 年前后舒纳(Scheiner)在开普勒设计的基础上制造出近代显微镜的原型。1665 年英国物理学家罗伯特·胡克(Robert Hooke)通过自己制造的能够放大 140 倍的显微镜(如图 14-1 所示)，在观察软木塞时发现了许多小的蜂房状结构，称之为“细胞”，至此，显微镜的发明使人们对动植物的认识进入了新的历史阶段。



图 14-1　罗伯特·胡克所制造的显微镜

在罗伯特·胡克发现细胞后不久，荷兰的安东尼·范·列文虎克(Antonj Van Leeuwenhoek)制造出放大率达到 270 倍的显微镜，实现了历史性的飞跃。他利用自己的显微镜广泛地观察研究微生物及血细胞等，并发现了细菌。1864 年前后，荷兰科学家惠更斯(Huygens)设计并制造出了结构简单效果较好的双透镜目镜，称为惠更斯目镜。至今，惠更斯目镜仍广泛应用于各类普通显微镜上。1870 年，德国物理学家恩斯特·阿贝(Ernst Abbe)系统地提出了显微镜的光学理论，并在显微镜的设计及光学玻璃制造等方面做了大量改进，发明了油浸物镜。1902 年，艾夫斯(E. E. Ives)进一步对成像

光路进行了改进，奠定了现代双目显微镜的基本系统。

随着科学技术的不断发展，光学显微镜性能越来越好，用途也越来越广。因此，了解光学显微镜的基本原理，正确使用光学显微镜是从事生命科学形态学研究人员必须掌握的一项基本技能。

一、显微镜的构造

普通光学显微镜的构造可分为机械装置和光学系统两大部分，这两部分很好地配合，才能发挥显微镜的作用。

（一）显微镜的机械装置

显微镜的机械装置包括镜座、镜筒、物镜转换器、载物台、推动器、粗动螺旋、微动螺旋等部件。

1. 镜座

镜座是显微镜的基本支架，它由底座和镜臂两部分组成。在它上面连接有载物台和镜筒，它是用来安装光学放大系统部件的基础。

2. 镜筒

镜筒上接接目镜，下接转换器，形成接目镜与接物镜（装在转换器下）间的暗室。从物镜的后缘到镜筒尾端的距离称为机械筒长。因为物镜的放大率是对一定的镜筒长度而言的。镜筒长度的变化，不仅放大倍率随之变化，而且成像质量也受到影响。因此，使用显微镜时，不能任意改变镜筒长度。显微镜的标准筒长为 160mm。

3. 物镜转换器

物镜转换器上可安装 3～6 个接物镜，普通显微镜一般装有 4 个物镜（4×，10×，40×，100×）。转动转换器可以按需要将其中的任何一个接物镜和镜筒接通，与镜筒上面的接目镜构成一个放大系统。

4. 载物台

载物台中央有一孔，为光线通路。在台上装有弹簧标本夹和推动器，其作用是固定或移动标本的位置，使得镜检对象恰好位于视野中心。

5. 推动器

推动器是移动标本的机械装置，由一横一纵两个推进齿轴的金属架构成。好的显微镜在纵横架杆上刻有刻度标尺，构成很精密的平面坐标系。如果需要重复观察标本的某一部分，在第一次检查时，可记下纵横标尺的数值，以后按数值移动推动器，就可以找到原来标本的位置。

6. 粗动螺旋

粗动螺旋是调节物镜和标本间距离的机件。老式显微镜粗螺旋向前扭，镜头下降接近标本，反之镜头提升远离标本；新型的显微镜通过旋转该螺旋，提升或降低载物台让标本接近或远离物镜。

7. 微动螺旋

使用粗动螺旋只可以粗略地调节焦距，要得到最清晰的物象，需要用微动螺旋做进一步调节。一般地，微动螺旋每转一圈镜筒移动 0.1mm(100μm)。

（二）显微镜的光学系统

显微镜的光学系统由反光镜、聚光器、接物镜、接目镜等组成，光学系统对样品起放大作用，形成标本放大的像。

1. 反光镜

较早的普通光学显微镜是用自然光检视物体，在镜座上装有反光镜。反光镜是由一个平面镜和一个凹面镜组成，可以将投射在它上面的光线反射到聚光器透镜的中央，照明标本。新型的显微镜镜座上装有光源，并有电流调节螺旋，可通过调节电流大小调节光照强度。

2. 聚光器

聚光器由聚光透镜、虹彩光圈和升降螺旋组成。聚光器可分为明视场聚光器和暗视场聚光器。普通光学显微镜配置的都是明视场聚光器，明视场聚光器有阿贝聚光器、齐明聚光器和摇出聚光器。阿贝聚光器在物镜数值孔径高于 0.6 时会显示出色差和球差。齐明聚光器对色差、球差和慧差的校正程度很高，是明视场镜检中质量最好的聚光器，但它不适于 4×以下的物镜。摇出聚光器能将聚光器上透镜从光路中摇出，满足低倍物镜(4×)视场照明的需要。

聚光器安装在载物台下，其作用是将光源经反光镜反射来的光线聚焦于样品上，以得到最强的照明，使物象获得明亮清晰的效果。聚光器的高低可以调节，使焦点落在被检物体上，以得到最大亮度。一般聚光器的焦点在其上方 1.25mm 处，而其上升限度为载物台平面下方 0.1mm。因此，要求使用的载玻片厚度应在 0.8～1.2mm 之间，否则被检样品不在焦点上，影响镜检效果。聚光器前透镜组前面还装有虹彩光圈，它可以开大和缩小，影响着成像的分辨率和反差，若将虹彩光圈开放过大，超过物镜的数值孔径时，便产生光斑；若收缩虹彩光圈过小，分辨率下降，反差增大。在观察时，通过虹彩光圈的调节再把视场光阑(带有视场光阑的显微镜)开启到视场周缘的外切处，使不在视场内的物体得不到任何光线的照明，以避免散射光的干扰。

3. 物镜

安装在镜筒前端转换器上的接物透镜利用光线使被检物体第一次成像。物镜成像的质量，对分辨力有着决定性的影响。物镜的性能取决于物镜的数值孔径(numerical apeature，N. A)，每个物镜的数值孔径都标在物镜的外壳上，数值孔径越大，物镜的性能越好。

物镜的种类很多，可从不同角度来分类。

根据物镜前透镜与被检物体之间的介质不同，可分为：

(1) 干燥系物镜。以空气为介质，如常用的 40×以下的物镜，数值孔径均小于 1。

(2) 油浸系物镜。常以香柏油或甘油为介质，此物镜又叫油镜，其放大率为90～100×，数值孔值大于1。

根据物镜放大率的高低，可分为：

(1) 低倍物镜，指1～6×，*N.A* 值为0.04～0.15；

(2) 中倍物镜，指6～25×，*N.A* 值为0.15～0.70；

(3) 高倍物镜，指25～63×，*N.A* 值为0.35～0.95；

(4) 油浸物镜，指90～100×，*N.A* 值为1.25～1.50。

根据物镜像差校正的程度来分类可分为：

(1) 消色差物镜。这是最常用的物镜，外壳上标有"Ach"字样，该物镜能去除红光和青光形成的色差。镜检时通常与惠更斯目镜配合使用。

(2) 复消色差物镜。物镜外壳上标有"Apo"字样，除了能校正红、蓝、绿三色光的色差外，还能校正黄色光造成的相差，通常与补偿目镜配合使用。

(3) 特种物镜。在上述物镜基础上，为达到某些特定观察效果而制造的物镜。如带校正环物镜、带视场光阑物镜、相差物镜、荧光物镜、无应变物镜、无罩物镜以及长工作距离物镜等。

目前，常用的物镜还有：半复消色差物镜(FL)、平场物镜(Plan)、平场复消色差物镜(Plan Apo)、超平场物镜(Splan)以及超平场复消色差物镜(Splan Apo)等。

4. 目镜

目镜的作用是把物镜放大了的实像再放大一次，并把物像映入观察者的眼中。目镜的结构较物镜简单，普通光学显微镜的目镜通常由两块透镜组成，上端的一块透镜称"接目镜"，下端的透镜称"场镜"。上下透镜之间或在两个透镜的下方，装有由金属制的环状光阑，物镜放大后的中间像就落在该环状光阑平面处，所以其上可安置目镜测微尺。

普通光学显微镜常用的目镜为惠更斯目镜(Huygens eyepiece)，在进行科学研究时，可根据需要选用合适的目镜，如补偿目镜(K)、平场目镜(P)、广视场目镜(WF)。在连接数码图像采集系统的第三目镜镜筒中装有专门的照相目镜。

二、显微镜的成像原理

显微镜的放大是通过透镜来完成的，单透镜成像具有像差，影响像质。由单透镜组合成的透镜组相当于一个凸透镜，其放大作用更好。

图14-2是显微镜的成像原理模式图。图中 L_1 为物镜，L_2 为目镜，AB为标本，A′B′为物镜放大的实像，A″B″为眼睛看到的由目镜放大的虚像。

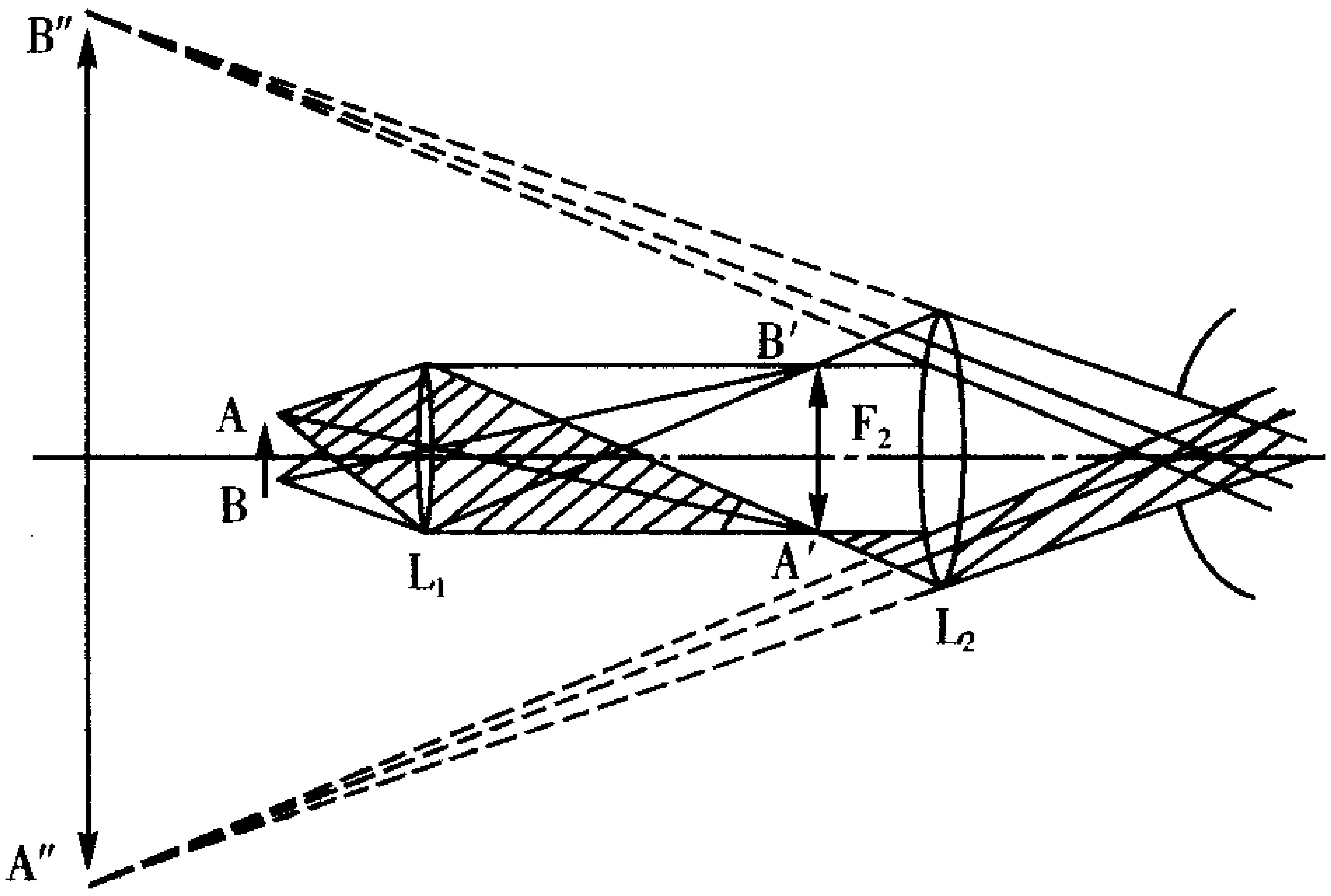


图 14-2　显微镜光学成像原理图

三、显微镜的性能

显微镜分辨能力的高低取决于光学系统的各部件。被观察的物体放大后，能否呈现清晰的图像，首先取决于物镜的性能，其次为目镜和聚光镜的性能。

(一) 数值孔径(*N.A*)

数值孔径也叫做镜口率(或开口率)，是物镜和聚光器的主要参数，在物镜和聚光器上都标有它们的数值孔径，是判断它们性能的最重要指标。数值孔径和显微镜的各种性能有密切的关系，它与显微镜的分辨率成正比，与焦深成反比，与镜像亮度的平方根成正比。

数值孔径可用下式表示：

$$N.A = n \cdot \sin(\alpha/2)$$

式中：n 为物镜与标本之间的介质折射率；α 为物镜的镜口角。

所谓镜口角是指从物镜光轴上的物点发出的光线与物镜前透镜有效直径的边缘所张的角度，如图 14-3 所示。镜口角 α 总是小于 180°。因为空气的折射率为 1，所以干燥物镜的数值孔径总是小于 1，一般为 0.05～0.95；油浸物镜如用香柏油(折射率为 1.515)浸没，则数值孔径最大可接近 1.5。虽然理论上数值孔径的极限等于所用浸没介质的折射率，但实际上从透镜的制造技术看，是不可能达到这一极限的。通常在实用范围内，高级油浸物镜的最大数值孔径是 1.4，甚至达到更高。

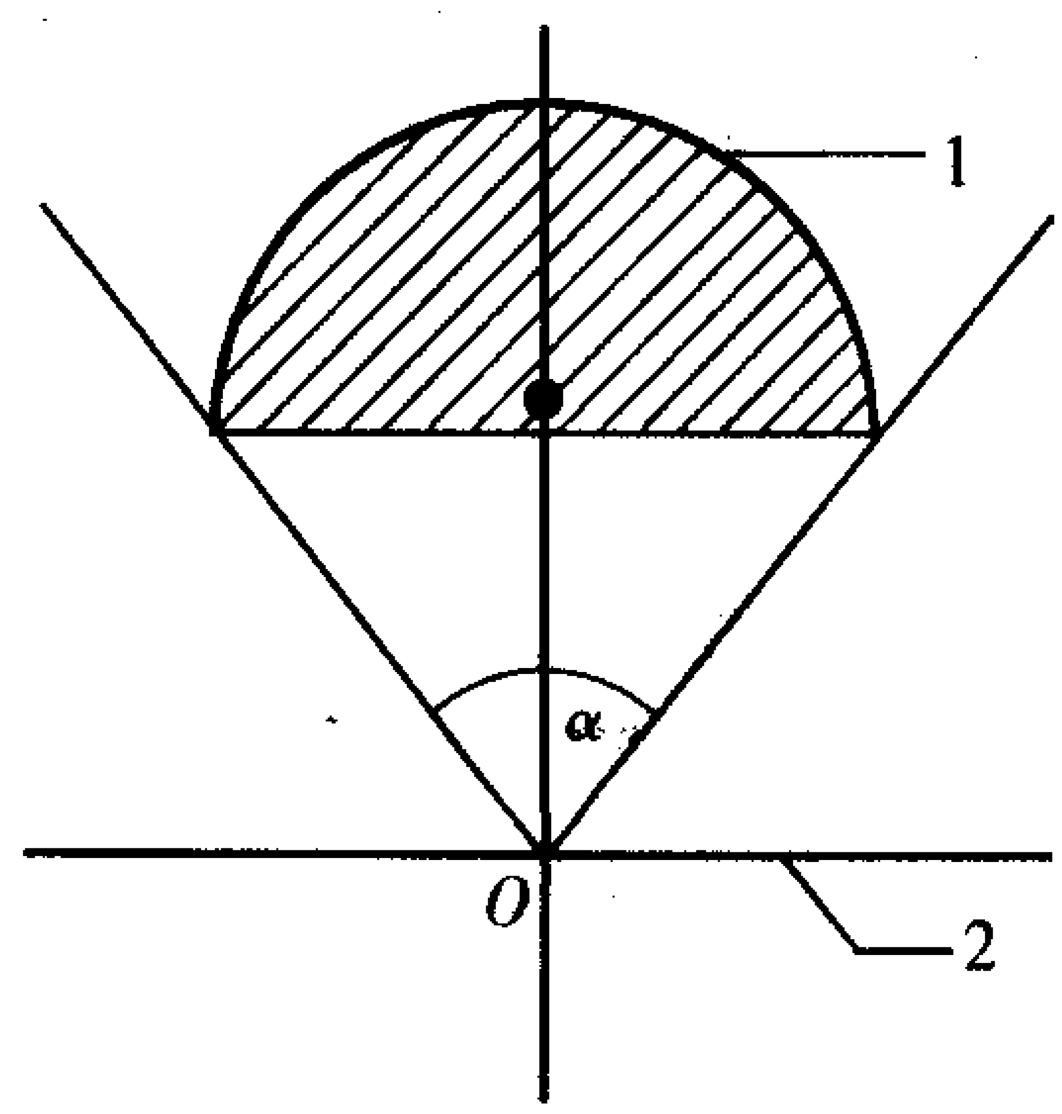


图 14-3　镜口角示意图

几种常用介质的折射率如表 14-1 所示：

表 14-1 常用介质的折射率

介质	空气	水	香柏油	α 溴萘
折射率	1	1.33	1.515	1.66

介质折射率对物镜光线通路的影响如图 14-4 所示。

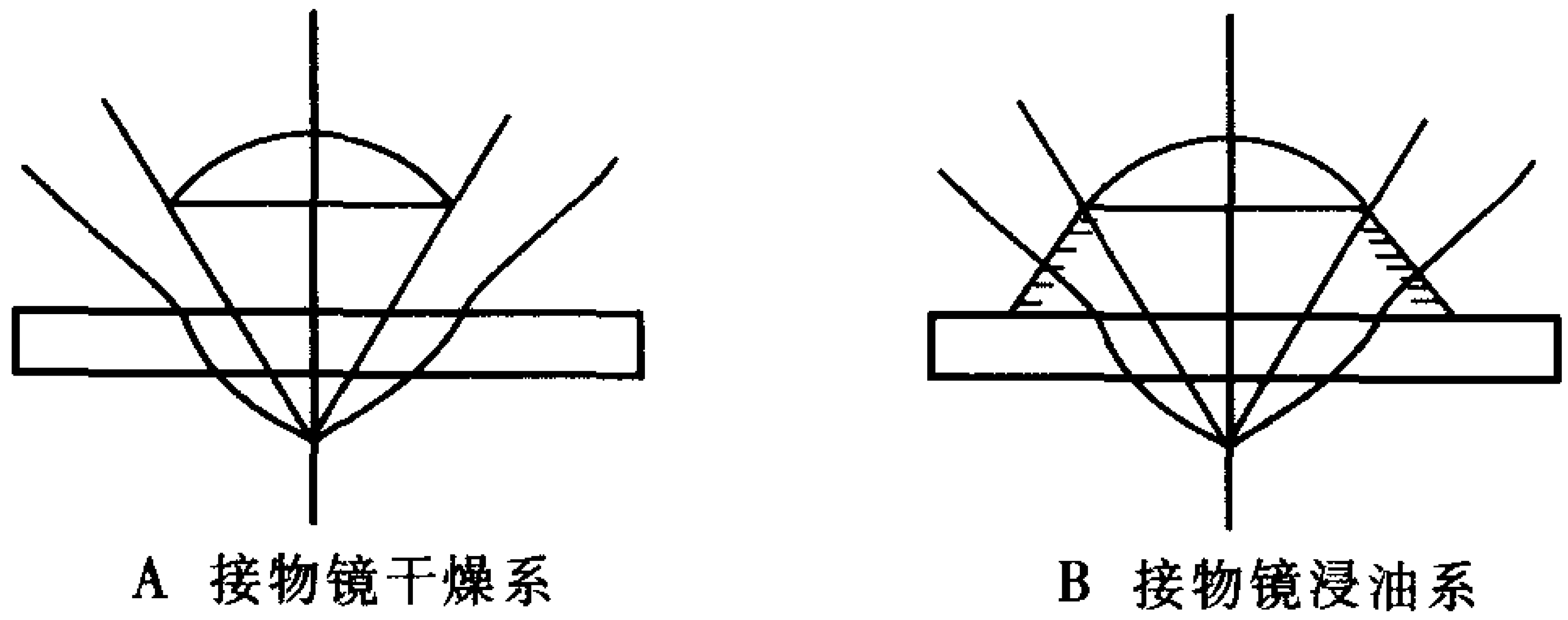


图 14-4 光线通过不同介质的示意图

（二）分辨率

通常人们把眼睛或显微镜所能分辨开的物体上的两个点的最小距离称为分辨率，也叫做分辨本领或分辨距离。正常条件下，人的眼睛在距目标 25cm 处，能将相距0.2mm的两个物体分辨开来，这是人眼分辨率的合理数值，即人眼的分辨率是 0.2mm。

显微镜的分辨率决定于光的波长、镜口率以及介质的折射率，用公式表示为：

$$R=\frac{0.612\lambda}{N.A}=\frac{0.612\lambda}{n\sin(\alpha/2)}$$

式中：

R 为分辨率；n 为介质折射率；α 为镜口角（标本对物镜镜口的张角）。

制作光学镜头所用的玻璃折射率为 1.65～1.78，所用介质的折射率越接近玻璃的折射率越好。由于镜口角 α 小于 180°，则 $\sin(\alpha/2)$约为 sin90°，接近于 1，当油镜头使用香柏油为介质时 n 为 1.515，则镜口率 $n\sin(\alpha/2)$可接近于1.5，所以$N.A$的最大值约为1.5，代入上式，同时取 λ 为可见光的平均波长约500nm也代入上式得：

$$R=\frac{0.612\times 0.5}{1.5}\approx 0.2(\mu m)$$

即光学显微镜的分辨率为 0.2μm。

物镜分辨率的高低与成像是否清楚有密切的关系。目镜没有这种性能，目镜只放大物镜所成的像。

（三）放大倍数

放大倍数 M 可由下列公式计算：

$$M=\frac{d_{人}}{d_{仪}}=\frac{0.2(mm)}{0.2(\mu m)}=1\ 000 倍$$

式中：

$d_{人}$ 为人眼的分辨率；$d_{仪}$ 为光学显微镜的分辨率。

所以一般光学显微镜的最大放大倍数通常为 1 000×。显微镜放大物体，首先经过物镜第一次放大成像，目镜在明视距离造成第二次放大成像。放大倍数就是最后的像和原物体两者体积大小之比例。因此，物体的放大倍数等于物镜放大倍数与目镜放大倍数的乘积。

随着数码技术的快速发展，现在所用的较高级的光学显微镜都拥有三目镜，其中第三目镜镜筒中装有专门的照相目镜与数码成像系统连接。由于照相目镜的放大倍数不一，有 0.7×、1×、2.5×及 3.3×等，又由于数码成像的像素不同，所以对采集到的数码图像只要注明物镜的放大倍数或标明一段相应的 bar 即可。

（四）焦深

在显微镜下观察一个标本时，焦点对在某一像面时，物像最清晰，这像面为目的面。在视野内除目的面外，还能在目的面的上面和下面看见模糊的物像，这两个面之间的距离称为焦深。物镜的焦深和数值孔径及放大率成反比：即数值孔径和放大率愈大，焦深愈小。因此调节油镜要更加仔细，否则容易使物像滑过而找不到焦平面。

四、显微镜的操作及注意事项

显微镜结构精密，使用时必须细心，须按以下操作步骤进行。

（一）观察前的准备

(1) 将显微镜放在距桌子边缘约 10cm 左右处。

(2) 打开光源，调节光强度。

将 10×物镜转入光路，将聚光器上的虹彩光圈打开到最大位置，通过调节电流旋钮来调节光照强弱。

(3) 调节光轴中心。

显微镜在观察时，其光学系统中的光源、聚光器、物镜和目镜的光轴及光阑的中心必须跟显微镜的光轴同在一直线上。带视场光阑的显微镜，先将光阑缩小，用10×物镜观察，在视场内可见到视场光阑圆球多边形的轮廓像，如此像不在视场中央，可利用聚光器外侧的两个调整旋钮将其调到中央，然后缓慢地将视场光阑打开，能看到光束向视场周缘均匀展开直至视场光阑的轮廓像完全与视场边缘内接，说明光线已经合轴。

（二）低倍镜观察

镜检任何标本都要养成必须先用低倍镜观察的习惯。因为低倍镜视野较大，易

于发现目标和确定检查的位置。

将标本片放置在载物台上，用标本夹夹住，移动推动器，使被观察的标本处在物镜正下方，转动粗调旋钮，使物镜接近标本；再在目镜观察下旋转粗调旋钮，慢慢升起镜筒（或下降载物台），直至物像出现；然后再旋转细调旋钮使物像清晰为止。用推动器移动标本片，找到合适的目的像并将它移到视野中央进行观察。

（三）高倍镜观察

在低倍物镜观察的基础上转换高倍物镜。较好显微镜的低倍和高倍镜头是齐焦的，在正常情况下，高倍物镜的转换不应碰到载玻片或其上的盖玻片。若使用不同型号的物镜，在转换物镜时要从侧面观察，避免镜头与玻片相撞。然后从目镜观察，调节光照，使亮度适中，缓慢调节粗调旋钮，使载物台上升（或镜筒下降），直至物像出现，再用细调旋钮调至物像清晰为止，找到需观察的部位，并移至视野中央进行观察。

（四）油镜观察

100×油镜的工作距离（指物镜前透镜的表面与被检物体之间的距离）很短，一般在0.2mm以内。普通光学显微镜的油镜没有“弹簧装置”，因此使用油镜时要特别细心，避免由于调焦不慎而压碎标本片并损坏100×油镜镜头。

使用油镜须按下列步骤操作：

(1) 将待检标本放到载物台上，用玻片夹夹住，依次用低倍和高倍物镜找到待检目的物，将其移至视野中央。

(2) 在玻片的镜检部位滴加一滴香柏油，将物镜转换为100×的油镜，向前轻微旋转细调旋钮至焦平面，同时将光圈完全开放，增加光亮度。

(3) 观察完毕，降下载物台，先用擦镜纸拭去镜头表面的油，再取擦镜纸折成尖角，蘸少许醇醚混合液（70%乙醚30%乙醇）或二甲苯（一般不用，仅在没有醇醚的情况下才用，用的量不能大），擦去物镜的透镜上的油渍（数次）。如果使用的是二甲苯，要用干净擦镜纸擦去残余的二甲苯。

(4) 清洁后，将显微镜各部分整理还原。

五、相差显微镜

荷兰科学家P. Zernike于1932年发现相差原理，并成功地运用于显微镜，并因此获1953年诺贝尔物理学奖。1941年，德国Zeiss公司制造出第一台相差显微镜(phase contrast microscope)，相差显微镜的最大特点是可以观察未经染色的标本和活细胞。因细胞各部细微结构的折射率和厚度的不同，光波通过时，波长和振幅并不发生变化，仅相位发生变化（光程差），这种光程差人眼无法观察。而相差显微镜通过改变这种相位差，并利用光的衍射和干涉现象，把相差变为振幅差来观察活细胞和未染色的标本。相差显微镜和普通显微镜的区别是用环状光阑代替可变光阑。

相差显微镜具有两个其他显微镜所不具有的功能：

（1）将直射的光（视野中背景光）与经物体衍射的光分开；

（2）增加直射光与衍射光的光程差，使两束光合轴后干涉加强，振幅增大或减小，从而引起强度的变化。

（一）原理和结构特点

光波有振幅（亮度）、波长（颜色）及相位（指在某一时间上光的波动所能达到的位置）的不同。当光通过物体时，如波长和振幅发生变化，人们的眼睛才能观察到，这就是普通显微镜下能够观察到染色标本的道理。而活细胞和未经染色的生物标本，因细胞各部微细结构的折射率和厚度略有不同，光波通过时，波长和振幅并不发生变化，仅相位有变化（相应发生的差异即相差），而这种微小的变化，人眼是无法加以鉴别的，故在普通显微镜下难以观察到。相差显微镜能够改变直射光或衍射光的相位，把透过标本的可见光的光程差变成振幅差，从而提高了各种结构间的对比度，使各种结构变得清晰可见。光线透过标本后发生折射，偏离了原来的光路，同时被延迟了 $1/4\lambda$（波长），如果再增加或减少 $1/4\lambda$，则光程差变为 $1/2\lambda$，两束光合轴后干涉加强，振幅增大或减小，提高反差。在构造上，相差显微镜有不同于普通光学显微镜两个特殊之处。因此可用以观察活细胞或未染色标本。相差显微镜用环状光阑代替可变光阑，用带相板的物镜代替普通物镜，并带有一个调整合轴用的望远镜。环状光阑是由大小不同的环状孔形成的光阑，它们的直径和孔宽是与不同的物镜相匹配的，其作用是将直射光所形成的像从一些衍射旁像中分出来；相板安装在物镜的后焦面处，相板装有吸收光线的吸收膜和推迟相位的相位膜，它除能推迟直射光线或衍射光的相位以外，还有吸收光使亮度发生变化的作用；调轴望远镜是用来进行合轴调节的。相差显微镜在使用时，聚光镜下面环状光阑的中心与物镜光轴要完全在一直线上，必须调节光阑的亮环和相板的环状圈重合对齐，才能发挥相差显微镜的效能。否则直射光或衍射光的光路紊乱，应被吸收的光不能吸收，该推迟相位的光波不能推迟，就失去了相差显微镜的作用。

相差装置为多功能系列显微镜中的附属装置，与普通显微镜配合使用。

（二）用途

相差显微镜最适合用于观察组织培养中活细胞的形态结构。活细胞无色透明，一般光镜下不易分辨，相差显微镜的特点是将活细胞不同厚度及细胞内都结构对光线产生的不同折射作用转换为光密度差异（明暗差），使反差明显，影像清楚。在组织培养中研究常用的是倒置相差显微镜（inverted phase contrast microscope），它的光源和聚光器在载物台的上方，物镜在载物台的下方，便于观察贴附在培养器皿底壁上的活细胞。

六、微分干涉差显微镜

1952 年，诺马斯基（Nomarski）在相差显微镜原理的基础上发明了微分干涉差显

微镜(differential interference contrast microscope,DIC),所以 DIC 显微镜又称 Nomarski相差显微镜(nomarki contrast microscope)。优点是能显示显微结构的立体图像。与相差显微镜相比,镜检标本可略厚一点,折射率差别也更大,故图像的立体感更强。

DIC 显微镜的物理原理完全不同于相差显微镜,技术设计要复杂得多。它包括四个特殊的光学组件:偏振器(polarizer)、DIC 棱镜、DIC 滑行器和检偏器(analyzer)。偏振器直接装在聚光系统的前面,使光线发生线性偏振。在聚光器中则安装了石英 Wollaston 棱镜,即 DIC 棱镜,此棱镜可将一束光分解成偏振方向不同的两束光(x 和 y),二者成一小夹角。聚光器将两束光调整成与显微镜光轴平行的方向。最初两束光相位一致,在穿过标本相邻的区域后,由于标本的厚度和折射率不同,引起了两束光发生了光程差。在物镜的后焦面处安装了第二个 Wollaston 棱镜,即 DIC 滑行器,它把两束光波合并成一束。这时两束光的偏振面(x 和 y)仍然存在。最后光束穿过第二个偏振装置,即检偏器。在光束形成目镜 DIC 影像之前,检偏器与偏光器的方向成直角。检偏器将两束垂直的光波组合成具有相同偏振面的两束光,从而使二者发生干涉。x 和 y 波的光程差决定着透光的多少。光程差值为 0 时,没有光穿过检偏器;光程差值等于波长一半时,穿过的光达到最大值。于是在灰色的背景上,标本结构呈现出亮暗差。为了使图像的反差达到最佳状态,可通过调节 DIC 滑行器的纵行微调来改变光程差,光程差可改变影像的亮度。调节 DIC 滑行器可使标本的细微结构呈现出正或负的投影形象,通常是一侧亮,而另一侧暗,这便造成了标本的人为三维立体感,类似大理石上的浮雕。

DIC 显微镜对未染色的细胞结构,特别是一些较大的细胞器,如核、线粒体等,成像立体感特别强,适合于显微操作。目前,基因注入、核移植、转基因等的显微操作常在这种显微镜下进行。

七、暗视野显微镜

暗视野显微镜(dark-field microscope)主要用于观察因反差或分辨力不足的微小颗粒。此种显微镜有一个暗视野集光器,使光线不直接进入物境,故呈暗视野。而标本内的小颗粒产生的衍射光或散射光进入物镜,暗视野中的颗粒呈明亮小点,如同在暗室可见一束光线中的微小尘粒一般。普通光镜最大分辨率为 0.2μm,暗视野显微镜则可分辨 0.004～0.2μm的微粒,适用于观察细胞内线粒体运动及标本中细菌等微粒的运动等。

第二节 生物荧光显微镜

Wood 在 1903 年设计了一种能吸收可见光和允许紫外光通过的滤片。在此基

础上，Reichert 在 1911 年设计了第一台荧光显微镜。以后，由于荧光染色方法和荧光装置的改进，特别是荧光抗体技术的建立及激发光源和滤片系统的发展，使荧光显微镜技术在细胞学、微生物学、免疫学等方面得到了广泛地应用。

由于有些物质（标本）被紫外光或可见光照射（激发）后，能发出比原来照射（激发）光线波长更长的新光线，这种特性被称之为荧光特性。能够观察到物质荧光特性的显微镜就称之为荧光显微镜。生物荧光显微镜与普通显微镜不同，它不仅能进行普通透射光的明场观察，还能进行落射光的荧光观察。

荧光显微镜和普通显微镜的区别：

（1）数值孔径大于普通物镜，因为荧光很弱，数值孔径大了才能便于观察，分辨率高于普通显微镜；

（2）照明方式通常为落射式，即光源通过物镜投射于样品上；

（3）光源通常为汞灯，可提供全波段的激发光；

（4）有两个特殊的滤光片，光源前的用以滤除可见光，目镜和物镜之间的用于滤除紫外线，以保护人的眼睛。

细胞中有些物质，如叶绿素等，受紫外线照射后可自发荧光；另有一些物质本身虽不能发荧光，但如果用荧光染料或荧光抗体染色后，经特定波长的激发光照射亦可发荧光，荧光显微镜就是对这类物质进行定性和定量研究的工具之一。

20 世纪 90 年代末以来，荧光显微镜的设计和制作又有了很大的发展，其发展趋势主要表现在，注重实用性和多功能方面的改进。在装配设计上趋于采用组合方式，集普通光镜加相差、荧光、暗视野、DIC、数码图像采集系统装置于一体（如图14-5所示），从而使其功能更齐全，适用范围更广泛。

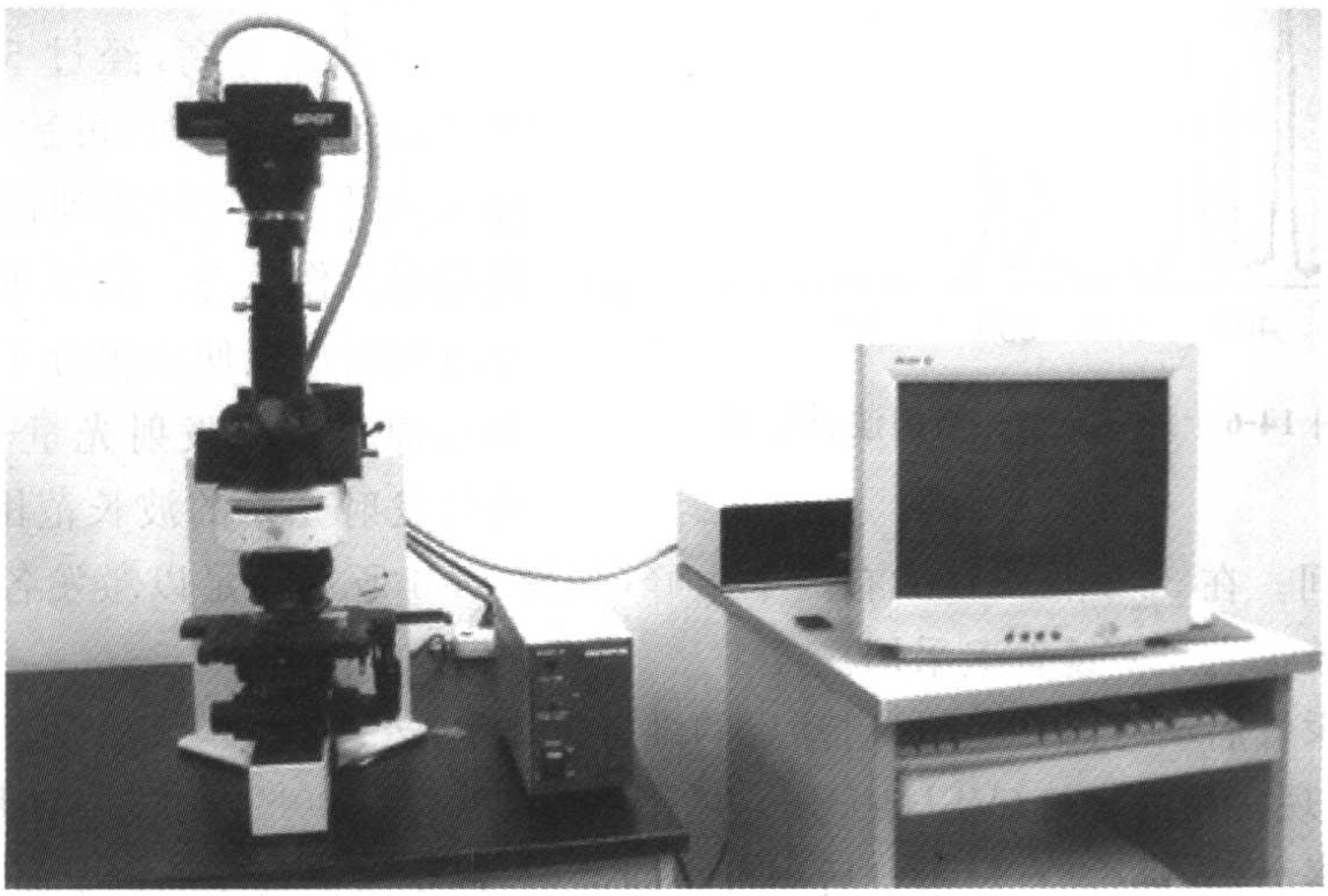


图 14-5　带有数码采集系统的荧光显微镜

一、荧光显微镜的分类及主要组成部分

（一）荧光显微镜的分类

1. 按照明方式分

按照明方式分为落射（反射）荧光显微镜和透射荧光显微镜。

2. 按结构形式分

按结构形式分为正置式荧光显微镜和倒置式荧光显微镜。

（1）正置荧光显微镜：可满足样品制成薄片后的观察方式。除可作可见光观察外，还可作荧光观察。

（2）倒置荧光显微镜：倒置荧光显微镜的组成和正置荧光显微镜一样，只不过物镜与照明系统颠倒，前者在载物台之下，后者在载物台之上。宽大的载物台使它能胜任各种活细胞应用实验，用于培养的活细胞的观察。

（二）荧光显微镜的主要组成部分

荧光生物显微镜主要由由四部分构成：

1. 照明系统

包括汞灯和卤素灯两部分，卤素灯提供可见光光源，汞灯可发射出各种波长（紫外到红外）的光，提供激发光光源。

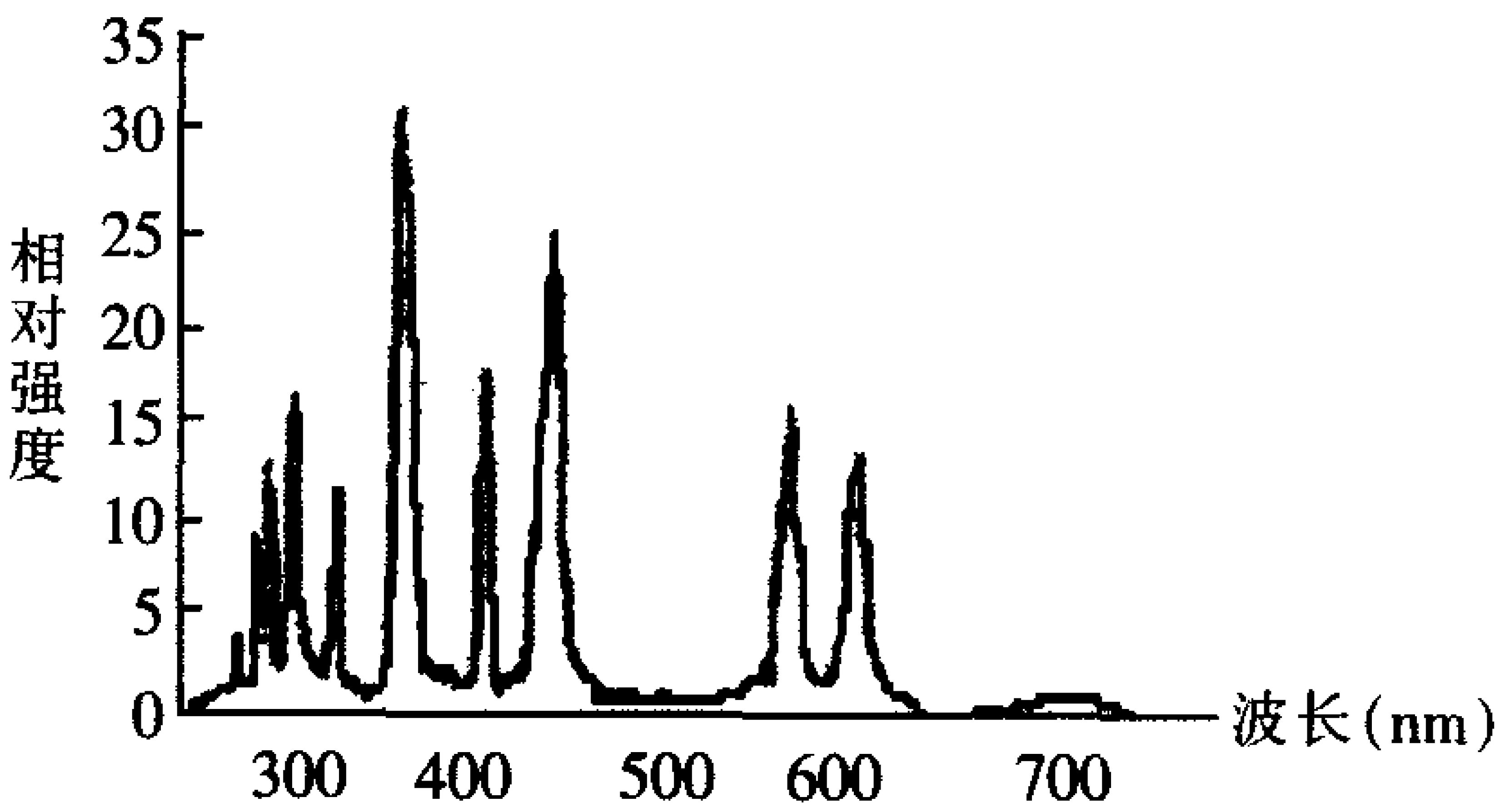


图 14-6 汞灯发射光谱的波长范围

汞灯由石英玻璃制作，中间呈球形，内充一定数量的汞，工作时由两个电极间放电，引起水银蒸发，球内气压迅速升高，经过 5～15min，当水银完全蒸发时，可达 50～70 个标准大气压，此时达到最高亮度形成稳定工作状态。高压汞灯的发光是电极间放电使水银分子不断解离和还原过程中发射光量子的结果。汞灯发射光谱的波长范围在 200～600nm 之间。在 365 和 435nm 有两个主峰（如图 14-6 所示），足以激发各类荧光物因此被荧光显微镜普遍采用。

高压汞灯启动时需要高压，启动后的维持工作电压一般为 50～60V，工作电流约 4A 左右。现常用的汞灯（VSH103），它的平均寿命约为 300h。灯泡在使用过程中，其光效是逐渐降低的。点燃汞灯后不可立即关闭，以免水银蒸发不完全而损坏电极，一般工作一次最少为 15～20min。灯熄灭后要等待 30min，完全冷却后才能重新启动。

汞灯由专门的电源控制器控制。

2. 滤光片系统

滤光片系统是荧光显微镜的重要组成部分，各厂家的荧光显微镜使用的滤片型号名称都不一样。

激发光滤片(Excitation filter)：其允许透过所需波长的光线用以照明(激发)样品中的荧光物质，同时阻挡其他无关波长的光线。

阻断滤光片(Barrier filter)：又称吸收滤片，其允许透过所需波长的荧光，同时阻挡掉激发光和荧光中与观察无关的其他波长的荧光，并吸收视野中残余的激发光，以保护眼睛。

分光镜：分光镜上镀的是一层铝而不是一层银，因为铝对紫外光和可见光的蓝紫色吸收很少，反射率达 90%以上，而银的反射只有 70%。分光镜可折射激发光并让荧光通过。

隔热滤片：能吸收热量，保护其他光学附件。

中性滤光片：可不同程度地吸收可见光，减弱光强度。

落射光装置：新型的落射光装置是将从光源来的光射到干涉分光滤镜后，波长短的部分(紫外和紫蓝)由于滤镜上镀膜的性质而反射，当滤镜对向光源呈 45°倾斜时，则垂直射向物镜，经物镜射向标本，使标本受到激发，这时物镜直接起聚光器的作用。同时，波长长的部分(绿、黄、红等)对滤镜是可透的，因此不向物镜方向反射，滤镜起了激发滤板的作用。由于标本的荧光处在可见光长波区，可透过滤镜到达目镜而被观察到，荧光图像的亮度随着放大倍数增大而提高，在高放大时比透射光源强。它除具有透射式光源的功能外，更适用于不透明及半透明标本，如厚片、滤膜、菌落、组织培养标本等的直接观察。近年研制的新型荧光显微镜多采用落射光装置，称之为落射荧光显微镜。

3. 光学放大系统

由物镜和目镜组成，是显微镜的主体，均采用特殊的光学材料(石英)，防止吸收紫外光线。为了消除球差和色差，目镜和物镜都由复杂的透镜组的构成。

目镜：在目前使用的研究型荧光显微镜多用三筒目镜。前两筒目镜用于人眼观察，目镜的规格为 10×。第三筒目镜与数码成像系统连接，该目镜的规格有 1×、2.5×和 3.3×。

物镜：各种物镜均可应用，但最好用消色差的物镜，因其自体荧光极微且透光性能(波长范围)适合于荧光。由于图像在显微视野中的荧光亮度与物镜镜口率的平方成正比，而与其放大倍数成反比，所以为了提高荧光图像的亮度，应使用镜口率大的物镜。物镜镜头的规格有 4×、10×、20×、40×、63×及 100×。

聚光镜：专为荧光显微镜设计制作的聚光器是用石英玻璃或其他透紫外光的玻璃制成。分明视野聚光器和暗视野聚光器两种，还有相差荧光聚光器。

(1) 明视野聚光器。在一般荧光显微镜上多用明视野聚光器，它具有聚光力强、使用方便等特点，特别适于低、中倍放大的标本观察。

(2) 暗视野聚光器。暗视野聚光器在荧光显微镜中的应用日益广泛。因为激发光不直接进入物镜,可以使用薄的激发滤板,增强激发光的强度。压制滤板也可以很薄,因紫外光激发时,可用无色滤板(不透过紫外)而仍然产生黑暗的背景,从而增加了荧光图像的亮度和反衬度,提高了图像的质量,观察舒适,可能发现亮视野难以分辨的细微荧光颗粒。

4. 镜架机械装置

用于固定材料和观察方便。

实际使用的荧光显微镜,还有许多附加机构,以使荧光观察得以实现。除选择和分离特定波长光线的滤色镜和照明光源外,其显微成像原理与普通显微镜大同小异。

二、荧光显微镜落射式照明原理

(一) 落射(反射)荧光显微镜的光路

落射荧光显微镜光路如图 14-7 所示。

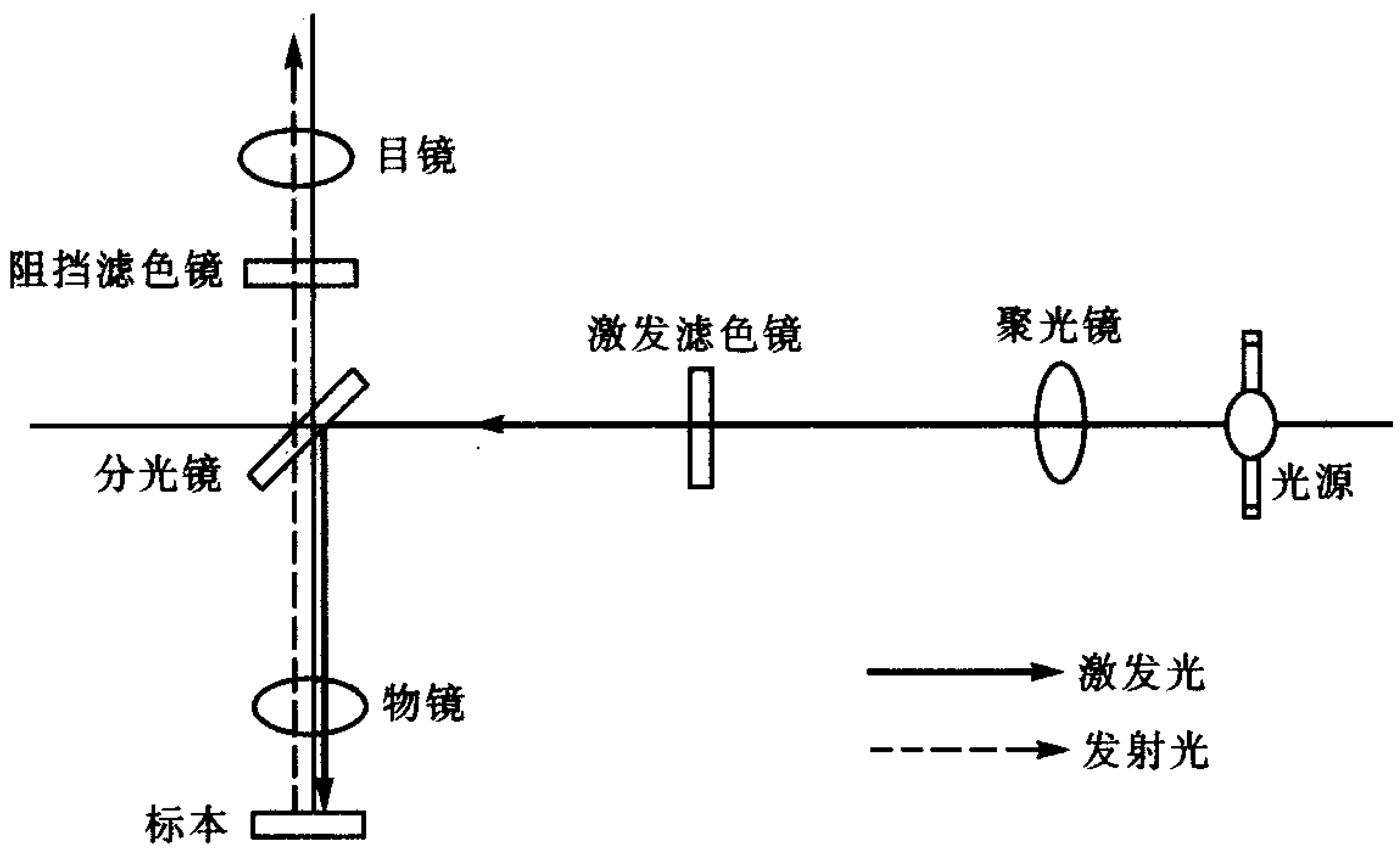


图 14-7 荧光光路示意图

(二) 工作原理

荧光显微镜中的滤色镜系统模块是核心部件,它由激发滤色镜、二色向镜(分光镜)和阻挡滤色镜按不同的波长要求,组合成滤色镜系统模块。

由高压汞灯发出的全波段光通过激发滤色片形成特定波长的激发光,再由分光镜反射到物镜上,物镜将其汇聚照射到标本上,标本受其照射(激发)产生荧光。标本发出的部分荧光和未被标本吸收的激发光通过物镜回到分光镜,分光镜反射掉大部分剩余激发光,而让荧光和少许激发光通过,并到达阻挡滤色镜上。阻挡滤色镜透过所需波长的荧光,阻挡掉激发光和其他波段的荧光。

在滤色镜系统模块中，分光镜是一种干涉滤光镜，当和照明光路成 45°角时，对波长在激发波区的光有很高的反射率，而对波长在荧光波区的光又有很高的透过率。换言之，分光镜对短波的激发光而言，它是反射镜，对标本上被激发出来的荧光而言，它是透光镜。

（三）荧光显微镜镜头

检测荧光素标记的探针的基本设备是高精密落射荧光显微镜，配备高数值孔径的物镜，物镜的玻璃采用石英材料。油镜要使用无荧光油，避免混合不同来源的油，否则会导致信号模糊不清或遮蔽。

三、荧光显微镜的基本操作及注意事项

（一）基本操作步骤

(1) 安装紫外防护罩；
(2) 打开汞灯的电源控制箱开关；
(3) 插入 Shutter，中断光路；
(4) 预热 5～10min 后，可进行观察；
(5) 将载有样品的载薄片放到载物台上；
(6) 使用三目观察筒时将观察筒的光路选择拉杆推进“双筒目镜 100%”；
(7) 选择接物镜；
(8) 旋转分光镜组件转盘，选择所需要的分光镜的组件：
　O ：观察透射光时用
　WU：观察蓝色荧光时用，例如 DAPI
　WB：观察绿色荧光时用，例如 FITC
　WG：观察红色荧光时用，例如 Rhodamine；
(9) 使用阻挡滤光片；
(10) 通过粗、细螺旋，调整焦距；
(11) 打开与显微镜连接的计算机，点击数码成像系统软件，采集数码图像。

（二）注意事项

(1) 因观察荧光使用的是高压汞灯，高压汞灯发出的光中含紫外光，对人眼有损害作用，故必须安装紫外防护罩。

(2) 在汞灯接通时或关上 10min 以内不要打开灯室，因灯室内部的温度很高，如果碰到的话，会引起烧伤。

(3) 为避免缩短汞灯的寿命，点燃汞灯后不可立即关闭，以免水银蒸发不完全而损坏电极，一般需要等 15min 后才能关闭。

(4) 汞灯熄灭后要等完全冷却后才能重新启动。否则，灯内汞蒸气尚未恢复到

液态，内阻极小，再次施加电压，无疑将造成短路，引起汞灯爆炸。这将损坏电器，同时使汞蒸气溢出，导致工作室污染。故关闭汞灯之后，不能马上又开，必须等待30min。

(5) 高压汞灯散发大量的热。因此，灯室必须有良好的散热条件，工作环境温度不宜太高。

(6) 汞灯的寿命约300h，在电源控制箱上有时间累计计数器，使用荧光显微镜的人要记录累计小时数，达到300h时，须更换一个新灯泡，否则亮度不够。

(三) 荧光显微镜标本制作要求

1. 载玻片

载玻片厚度应在0.8～1.2mm之间，太厚的玻片一方面光吸收多，另一方面不能使激发光在标本上聚集。载玻片必须光洁，厚度均匀，无明显自发荧光。有时需用石英玻璃载玻片。

2. 盖玻片

盖玻片的厚度约0.17mm，光洁。为了加强激发光，也可用干涉盖玻片，这种特制的盖玻片表面镀有若干层对不同波长的光起不同干涉作用的物质(如氟化镁)，它可以使荧光顺利通过，而反射激发光，这种反射的激发光可激发标本。

3. 标本

组织切片或其他标本不能太厚，否则细胞重叠，影响判断。

4. 封片剂

封片剂必须无自发荧光、无色透明，现常用含抗淬灭剂(anti-fade)的封片剂(见本书第二章第四节相关内容)。加上封片剂后，盖上盖玻片，再用指甲油(实际操作中发现美宝莲牌指甲油封片效果好，可做到薄而均匀)将盖玻片四周封固，这样即可保持盖玻片不滑动，又可保持封片剂不被蒸发。在没有抗淬灭剂的情况下，可使用30%的PB甘油，因为甘油无自发荧光。还可用甘油和0.5mol/L pH为9.0～9.5的碳酸盐缓冲液的等量混合液作封片剂。

注意：封片剂绝不能用二甲苯，因为二甲苯能自发荧光。

5. 镜油

用油镜观察标本时，必须使用镜油，最好使用特制的无荧光镜油。

6. 镜头的清洁

在油镜使用完毕后，需用擦镜纸沾上3：7的醇醚混合液轻轻擦拭。

7. 及时观察

标本染色后应及时观察，因时间久了荧光会逐渐减弱。若标本放在聚乙烯塑料袋中4℃保存，可延缓荧光减弱时间。

8. 荧光亮度的判断标准

一般分为四级，即“－”——无或可见微弱荧光；“＋”——仅能见明确可见的荧光；“＋＋”——可见有明亮的荧光；“＋＋＋”——可见耀眼的荧光。

(四) 荧光图像的记录方法

荧光显微镜所看到的荧光图像，一是具有形态学特征，二是具有荧光的颜色和亮度，在判断结果时，必须将二者结合起来综合判断。随着计算机技术与数码技术的发展，研究型荧光显微镜都与计算机连接，装有数码成像系统，点击数码成像系统软件，即可采集数码图像。

(五) 荧光显微镜的维护和保养

1. 安装仪器、接拆电缆或更换灯泡时要关闭电源

为防止触电及损坏仪器，在安装仪器、接拆电缆或更换灯泡之前，务必关闭显微镜上的电源开关并拔掉电源线。

2. 勿使仪器受潮

显微镜受潮，可能会导致电路短路从而损坏仪器或发生危险。如果不小心将液体溅到仪器上，请立即关闭电源开关并拔掉电源线，然后用一块干布檫干。如有液体进到仪器里面，请立即停止使用并与专业工程师联系。

3. 清洁滤光片及透镜

勿使透镜或滤光片沾上灰尘、指纹等。透镜、滤光片等上面的污迹会对图像产生不良影响。如果透镜和滤光片污染，请按下述方法予以清洁。

(1) 用吹球吹去灰尘，如不行，可用软刷或纱布轻轻将灰尘擦去。

(2) 如果透镜或滤光片上有指纹或油脂，可用一块沾有适量 3∶7 的醇醚混合液的擦镜纸或绸布擦拭，擦镜纸或绸布一个地方只能用来擦拭一次，而不能做两次或两次以上的擦拭。

4. 保管

显微镜应存放在干燥、通风、温度适宜的环境，避免透镜发霉。对暂时不用的物镜、目镜、滤光块等存放在干燥箱或备有干燥剂的容器里。

5. 定期检查

为保持最佳的操作性能，需对仪器进行定期检查。

其他部位的清洁：用中性去污剂擦拭，避免用有机溶剂。

第三节　细胞遗传工作站

一、细胞遗传工作站的组成

细胞遗传工作站通常由以下几部分组成：研究级正置荧光显微镜、高分辨率 CCD、系统控制软件和应用软件。现以由一台 ZEISS Axioskop 2 plus 正置荧光显微镜、一个长时间曝光(long time exposure)的 META 摄像头和一台用来操作的计算

机组成，并附带有原位图像系统（isis）操作软件和染色体核型系统（ikaros）操作软件的细胞遗传工作站为例（如图 14-8 所示），介绍细胞遗传工作站的原理及使用方法。



图 14-8　细胞遗传工作站

二、细胞遗传工作站的应用

(1) 对荧光染色或荧光标记的生物样品进行核内观察和分析；
(2) 对荧光标记的染色体进行观察和分析；
(3) 建立染色体核型排队和分析。

三、细胞遗传工作站的工作原理

细胞遗传工作站的荧光显微镜部分的工作原理同生物荧光显微镜（见本章第二节），它与一般生物荧光显微镜不同的是拥有一个 100× 的油镜头，可以观察染色体和细胞核内的其他细节，故一般不用作常规观测，而只用于高级观测。细胞遗传工作站配置的 isis 和 ikaros 两个操作软件功能十分强大。

四、基本操作

（一）荧光显微镜的基本操作步骤

(1) 打开汞灯的电源控制箱开关；
(2) 插入 Shutter，中断光路；
(3) 预热 5～10min 后，可进行观察；

(4) 将载有样品的载玻片放到载物台上；

(5) 旋转分光镜组件转盘，选择所需要的分光镜的组件；

(6) 选择 10×接物镜；

(7) 使用三目观察筒，将光路选择拉杆拉出；

(8) 通过粗、细螺旋的调整，找准焦平面；

(9) 在样品的盖玻片上滴一滴镜油，转入 100×油镜镜头；

(10) 通过调整细螺旋，寻找焦平面；

(11) 点击成像系统软件，采集数码图像。

(二) isis 的基本操作

1. 开始

打开计算机，移动鼠标至计算机桌面的 isis(in site image system)图标，双击鼠标左键，启动 isis 程序。isis 程序屏幕显示分成图像区域、命令按钮和数据/状态区域。

在事件名区域点击鼠标左键，输入事件名，点击鼠标右键结束数据输入。利用鼠标中键，从数据库载入或退出一个已有的事件。图像编号将被自动插入至图像号区域。

2. 图像采集

点击屏幕右下角相应的“实验”按钮，选择一个实验类型。实验类型将决定一个新的图像采集顺序，如“BG”(为蓝—绿)可采集被 DAIP 和 FITC 双染的颜色，同样，“BGR”为采集从蓝→绿→红的颜色通道。

要按顺序采集所有的颜色通道，点击屏幕右上角的“光谱”符号。移动鼠标指针到命令按钮“图像采集”上，按鼠标左键激活该功能。在计算机屏幕上，可以见到一个颜色通道的实时图像，该实时图像可被用来对焦和将观察的对象放置于显示中央。

通常，程序的自动整和会给出最好的结果。可以通过按键盘“A”键激活或去激活自动功能。当自动被激活，将显示一个白色的“A”。

点击鼠标右键(或按“Enter”)，便开始图像采集工序，isis 将自动决定优化的整合时间。根据所使用的显微镜类型，isis 可以自动控制滤色片的转换，或等待手动转换滤色片。若显微镜是手动转换，必须在转换滤色片后，按鼠标右键或按“Enter”键，处理后续的颜色通道。

如果图像包含有过度的染色或不需的对象，如细胞核或细胞碎片，可以使用“Up”和“Down”箭头键，调节自动整和时间标量矩形。通过减小该标量矩形，可以从计算整和时间去除这些对象，以获得比较好的图像质量。标量矩形的大小不影响图像采集的大小。

3. 图像处理

在所有的颜色通道采集完后，isis 将自动在屏幕上显示合成的图像(或其中的第一个图像视野)。可以利用屏幕右侧的命令按钮来改善图像的质量。按鼠标左键激

活一个命令按钮，按鼠标右键终止功能。每一个处理步骤都可以在任何时候通过键盘“Backspace”键撤销。

(1) 去除背景。通过调节“阈值下限”，可以降低背景和非特异性信号，所有低于阈值下限强度的信号显示成黑色。

自动：通过点击“光谱”符号选择所有颜色通道，然后按“L”(阈值下限)。

手动：首先点击“光谱”符号，然后按“阈值下限”命令按钮。isis 将转到第一个颜色通道。左右移动鼠标，可以减低或增加背景。阈值下限在插入的直方图(一个代表强度分布的图)中突出显示。另外，整和时间也被显示在直方图中。

在将一个颜色通道设置好优化的阈值下限后，按鼠标右键转到下一个颜色通道。在完成最后的颜色通道选择后，isis 将自动结束功能。

(2) 优化对比度。图像对比度的调节可以通过“阈值上限”命令进行。像设置阈值下限一样，isis 提供了自动和手动的模式。

自动：通过点击“光谱”符号选择所有颜色通道，然后按“U”(阈值上限)。

手动：首先点击“光谱”符号，然后按“阈值上限”命令按钮。isis 将转到第一个颜色通道。左右移动鼠标，可以减低或增加对比度。阈值上限应该被增加到红色小点出现(向左移动鼠标)，这些小点标志饱和像素。

根据应用的要求，可以用不同方式处理对比度。对于染色体，在衬染的颜色通道中，着丝点可显示出饱和色彩，同时，染色体上的其他着色通道可被调节成能看见有少量红色的像素。如果对局部(单独部位)杂交信号感兴趣，则可以饱和这些信号，以便于杂交点记数。

(3) 像素漂移校正。利用不同滤色片组采集的荧光图像可能会造成像素点的漂移。这将造成各种颜色通道不能配合。可以在 isis 的“颜色位置补正”功能中，利用自动或手动模式进行校正。

自动：点击“光谱”符号选择所有的颜色通道，点击“颜色位置补正”命令按钮，并按下“A”(分配)。

手动：首先，点击“光谱”符号，然后点击“颜色位置补正”命令按钮。isis 将转换至第一个颜色通道。利用箭头键能在任何方向上移动被激活的颜色通道图像，以便配合其他信号。按下鼠标右键，转换至下一个颜色通道。

(4) 显示个别颜色。对于 FISH 图像分析，个别颜色通道显示使功能会有些帮助。点击“光谱”符号或一个特定的颜色通道，并用鼠标左键点击“个别颜色”命令按钮，能激活该功能。点击鼠标右键，能转换至下一个颜色通道或离开此功能。

(5) 亮度。对于一些样品来说，如果仅调整显示在屏幕上或打印输出的颜色亮度，而不去改变原始图像文件的颜色组成会更有用。在“亮度”功能中，可以通过鼠标调整个别的颜色。左右移动鼠标，可以增加或减少个别颜色通道的色彩亮度。任何改变仅被用于显示的图像，但不会被储存。

4. 其他功能

(1) 添加图像采集。当采集一个很分散的中期，并且其分布大于采集图像的单

个视野时，添加图像采集功能可以令不在同一视野中的染色体包括在内。无须按鼠标右键终止采集图像，只要双击鼠标左键，第一个图像视野将以缩小的尺寸显示在采集图像窗口的右上角，而实时图像则显示在屏幕中央。可以对这个第二次采集的图像进行对焦并将其放在显示窗口的中央，并在显微镜上调节光强度。如果染色体分布很散，则可双击鼠标左键采集其他的图像区域，从而获得另外的图像。最终，可以通过按鼠标右键获取最后图像后，退出图像采集模式回到中期视图。图像区域将会自动地以递增方式命名为“A”“B”“C”，…并且通过箭头键在它们之间转换。

(2) 用多图像区域处理中期。当双击图像区域的字母，isis 将转换成图库观察模式，以并排的四个图像区域显示在屏幕上。这便能方便地在要保留的视野中屏蔽需要的中期，删除重复的部分。按鼠标左键选择图像视野“A”，并可按下述处理。当分隔完所有染色体，通过点击字母“A”右侧的箭头转换到下一个图像“B”进行处理。在处理完最后图像后，可以利用“对象校对”命令，复审中期的处理。

(3) 直方图。直方图是色彩水平分布频数的图像表示。对于 FISH 图像，它是一个好的图像质量指示器。直方图可以在鼠标左键点击其图标后显示，同时可以通过按下任何键隐藏。

低亮度显示在直方图的左侧，高亮度在右侧。一个“未经加工”的图像应该有两个极值，位于左侧的最大值代表了背景信号，位于右侧的比较小的极值是由一些特定信号产生的。两个极值应该被很好地拉开。

如果整和时间过短，这两个极值将会靠得很近。曝光过度的图像显示出其右极值移动到右侧极端，在很多情况下，其右侧的一半会被剪切掉。

(4) 对象计数。该功能可计数图像中的对象(如：染色体)。该功能提供了一个半自动和手动模式：

半自动计数：所有的计数对象按照其大小排列。每一个对象被框住并被标记“＋”。如果一个框内含有一个以上的对象，每一个附加的对象可以通过点击鼠标左键突出显示，isis 将自动增加对象的计数，该计数显示在图像下方的右侧。

手动计数：计数对象可以通过手动来计数。在一个对象上点击鼠标左键，会在对象上出现一个“＋”，isis 将自动增加对象的计数，该计数显示在图像下方的右侧。

(5) 在 isis 中储存 FISH 图像。isis 在每一操作步骤后会自动储存图像。另外，当要改变一个事件或退出程序时，也会被问及是否储存图像。

可以在任何时候通过按下“Ctrl”＋“S”键储存图像。

(三) ikaros 的基本操作

1. 开始

打开计算机，移动鼠标至计算机桌面的 ikaros(interactive karyotyping system)图标，双击鼠标左键，启动 ikaros 程序。

ikaros 程序屏幕显示分成图像区域，命令按钮和数据区域。

在事件名区域点击鼠标左键，输入事件名，点击鼠标右键结束数据输入。图像编

号将被自动插入相对应的区域。

2. 图像采集和中期处理

(1) 图像采集。移动鼠标指针至命令按钮“图像采集”按钮上，按鼠标左键激活该功能。当打开显微镜上摄像头光闸后，就可以在计算机屏幕上见到实时图像，将见到的中期对焦并放在显示窗口的中央。调节显微镜上的光线强度至仅可见少量的红色像素点。这些红色指示饱和的像素点。

当照明调节准确后，就可以按鼠标右键或键盘上的“Enter”键。相互协调的照明控制将保证图像的最佳曝光。立刻，中期图像就会出现在屏幕上。

如果采集一个很分散的中期，这个中期分布大于采集图像的单个视野，添加图像采集功能可以将不在同一视野的染色体包括在内。无须按鼠标右键终止采集图像，只要双击鼠标左键，第一个图像视野将以缩小的尺寸被显示在采集图像窗口的右上角，实时图像显示在屏幕中央，可以对这个第二次采集的图像进行对焦并将其放在显示窗口的中央，在显微镜上调节光强度。如果染色体分布很散，可以双击鼠标左键来采集其他的图像区域，以获得另外的图像。最终，可以通过按鼠标右键，获取最后图像后退出图像采集模式，回到中期。图像区域将会被自动地以递增方式命名为“A”，“B”，“C”，…通过箭头键在它们之间切换。

用多图像区域处理中期，当双击图像区域的字母，ikaros 将转换成图库观察模式，以并排的四个图像区域显示在屏幕上。这使得方便地在要保留的视野中屏蔽需要的中期，删除重复的部分。按鼠标左键选择图像视野“A”，并用鼠标左键点击打开命令按钮，图像视野“A”以原来大小显示，并可按下述处理。当分隔完所有染色体，通过点击字母“A”右侧的箭头转换到下一个图像“B”进行处理。在处理完最后图像后，可以利用“对象校对”命令，复审中期的处理(见下述步骤(8))。

(2) 中期处理。当回到中期视图，第一个中期图像视野将会显示。将中期处理成单独的染色体要通过几个步骤实现。通常，可以利用屏幕右面从上而下的命令按钮进行。可以通过在命令按钮上点击鼠标左键激活其功能，利用鼠标右键终止功能。每一个处理步骤可以在任何时候通过键盘“Backspace”键撤销。

(3) 对象阈值。对象阈值被 ikaros 被定义为灰度水平，将对象与背景区别。如果对象阈值设置的太低，染色体分离将不够充分。这将导致一些对象包含有多个染色体。然而，当阈值设置太高，则会导致染色体端粒区域太亮，从而丢失这些部分。对于优化的设置，应该是，即使是染色体最亮的部分也能从背景中分离出来而没有任何丢失。在点击命令按钮“对象阈值”后，可以左右移动鼠标来降低或增加阈值。通过点击鼠标右键，可以终止该功能。

(4) 屏蔽中期。利用该功能能删除分散在中期外的不需要的对象。点击鼠标左键激活“屏蔽中期”命令。当在环绕中期画一条线后，在线外的所有对象会被剔除。点击鼠标左键作为起点，移动鼠标画线。用鼠标左键能定义线上的界标点。重复这一操作直到将鼠标移至线的起点，关闭这条线。当按下鼠标右键，ikaros 将自动连接

最后点和起点，并将外围的所有对象删除。

(5) 删除。利用"删除"功能，可以在分离的中期上快速删除个别对象，如细胞核或碎片。移动鼠标指针到"删除"命令按钮并按下鼠标左键，所有对象的轮廓将被以不同颜色突出显示。移动鼠标指针到要删除的对象上并按下鼠标左键。对于所有要删除的对象，可以重复这一操作，按下鼠标右键就可以终止该功能。

(6) 分隔。核型排队只有在染色体都呈现为单个个体时才能进行，因此，分隔染色体是中期处理中的基本功能。"分隔"功能通过在相应的命令按钮上点击鼠标左键激活。像"删除"功能一样，所有的对象轮廓将被以不同颜色突出显示。这样就能方便地区分出完全分隔地染色体和那些仍然毗连或重叠的染色体。

ikaros 提供几种分隔染色体的选项，最方便的方法则是通过按"A"键激活的自动功能。ikaros 将会试着分隔尽可能多的染色体，可以通过屏幕看见 ikaros 是如何画分隔线的。随着每一步骤的进行，被分隔的染色体轮廓线颜色会改变，以显示出该染色体已经被成功分隔。

注意，每一个自动分隔步骤都应该检查。如果 ikaros 产生了错误，则可以通过移动鼠标指针到选择的分隔线上，按下键盘上的"Del"键，取消该分隔。

另外，可以通过移动鼠标指针到一个含有多个染色体的对象上，用半自动模式进行分隔。按住鼠标左键直到 ikaros 程序出现"嘟"的响声，被分隔染色体轮廓颜色改变，指示出成功的分隔。可以重复这一过程直到所有的染色体均被分隔。

但是，如果染色体连接部分很多，ikaros 可能会在准确分隔上产生困难。对此，就必须通过手工画分隔线进行分隔。可以通过在要分隔的染色体附近背景上，点击鼠标定义分隔线的起点(但不要在染色体上)。该染色体将被自动放大一倍便于分隔。然后，移动鼠标画出一条线，再次点击鼠标左键以定义界标点，移动鼠标画出该线的下一部分，一步一步，这样就能明确地画出短线段，能很平滑地在两条染色体之间进行分隔。

通过按下鼠标右键，可以完成分隔线并终止该功能。

(7) 重叠。染色体的重叠可以通过两个方法解决。

简单的"X"型重叠可以在"分隔"功能中解决。移动鼠标指针至重叠的部分，按下中键直到 ikaros 程序发出一个"嘟"的响声，染色体轮廓颜色发生改变，显示出成功分隔。至此，可以移动两个染色体中较小的那个至一个空位，通过点击鼠标右键定在新的位置。如果自动重叠分隔结果不理想，可以按"Ecs"键取消。

不能通过自动计算解决的比较复杂的染色体重叠，可以利用"重叠"功能命令手工完成。通过在命令按钮上点击鼠标左键激活此项功能。利用鼠标，必须在重叠区域的四个角外定出 4 个界标点。像在"分隔"功能中一样，可以在要被分隔的染色体附近背景上，定出第一个界标点(但不要在染色体上)。然后，移动鼠标画出跨过第一条染色体的线，再次按鼠标左键定出第二点，移动鼠标跨过另一条染色体，再点击鼠标左键，移动鼠标又跨过第一条染色体。在定完第三个界标点之后，按下鼠标右键，

ikaros 就会自动接着完成在重叠区域上的矩形。可以移动其中一个较小的染色体至一个空位，通过按鼠标右键定位于此。如果自动重叠分隔结果不理想，可以通过按“Ecs”键取消。

(8) 对象校对。该功能可检查是否所有的染色体均被分隔。当在相应命令按钮上按下鼠标左键，所有的对象将会按大小排列成行。这样，含有数个染色体的对象就会被容易看出。在“对象校对”功能中，可以通过画一条分隔线分隔染色体(见上述“分隔”功能)。当在“对象校对”功能中，分隔染色体后，按下“Enter”键，这些被分隔的染色体将以单个对象出现。按鼠标右键，可以退出该功能。

3. 建立核型排队

在中期分隔完所有染色体后，可以转到核型视图，进行染色体的分类。移动鼠标指针至屏幕右上角的小核型排队窗口，按下鼠标左键，ikaros 立刻显示空的核型窗口以及按染色体大小排队的染色体缓冲区。

(1) 分配染色体。这是建立核型排队最主要的功能。移动鼠标至“分配”命令按钮，按下鼠标左键，分配染色体至其相应的类别。这里有几种自动和交互性分类选择。

按“A”键，ikaros 将依据该分条带技术训练的分类器自动建立一个核型。注意，这个核型排队仅是一个建议，它必须由经验丰富的细胞遗传学研究人员进行审核和校正。根据中期质量，或多或少的中期可以被分类，一些“困难”的染色体将被留在缓冲区。

对于人工分类，通过移动鼠标指针至染色体上，按下鼠标左键，被选中的染色体将由蓝色矩形突出显示，移动鼠标指针至要求的位置，再次点击鼠标左键将染色体移至新的位置。

鼠标左键双击缓冲区中的染色体，可以将该染色体移到核型排队中的第一个空位。

鼠标左键双击染色体分类中的一个，就可以将染色体缓冲区中的第一个染色体转送至其分类。

为了更好显示，同类染色体也可以通过在此功能装配能够进行交换。首先，选择一个上述的染色体，按鼠标左键在同一分类中的另外一个染色体上，进行互换。

按键盘上的“Backspace”键，可以将所有的染色体移回染色体缓冲区内(确认后)。

用鼠标左键较长时间点击一条染色体，可以使其旋转 180°。另外，也可以使用下述两个“旋转”功能。

按下鼠标右键，终止“分配”功能。

(2) 180°/90°旋转染色体。激活此功能，可以移动鼠标指针至命令按钮“旋转180°/90°”，按鼠标左键。移动鼠标指针到染色体上，按鼠标左键，染色体将被旋转180°。可以通过双击鼠标左键实现 90°旋转。按下鼠标右键终止此功能。

(3) 染色体任意旋转。如果想任意角度旋转染色体，鼠标点击命令按钮“旋转×°”，如上述选择一条染色体，左右移动鼠标，染色体将顺时针或逆时针旋转。按下鼠标左键固定该染色体的新旋转角度。按鼠标右键终止该功能。

(4) 染色体垂直移位。为了排列着丝点，染色体可以上下移位，鼠标右键按命令按钮“移位”，选择一个染色体，左右移动鼠标，该染色体就可以上下移动。按下鼠标左键可以固定该染色体的新位置。按鼠标右键终止该功能。

(5) 储存中期和核型。每一步骤完成后，中期和核型均被自动储存。

第十五章　激光扫描共聚焦显微镜

激光扫描共聚焦显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM),是在显微镜基础上配置激光光源、扫描装置、共轭聚焦装置和检测系统而形成的新型显微镜,是目前应用于细胞分析学的最先进仪器之一,如图15-1所示。与荧光显微镜相比,CLSM具有高分辨率、高灵敏度等特点,并能实现组织光学切片、三维重建及对样品中某些特定成分进行定性或定量分析等特殊功能。

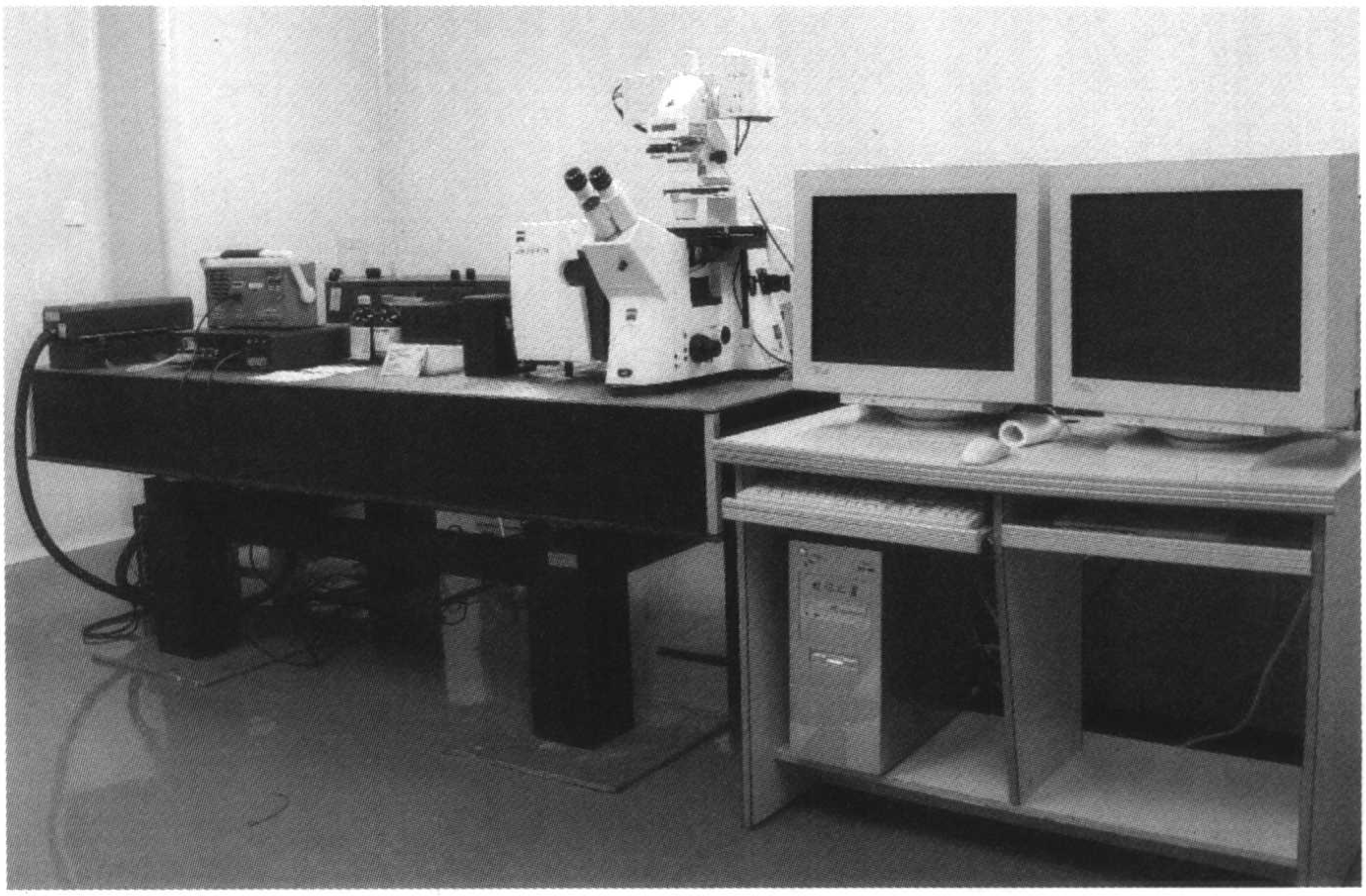


图 15-1　激光区聚焦显微镜

1955年,Marvin Minsky基于在不染色的活体脑组织中观察神经网络的目的,建立了第一台共聚焦显微镜,并于1957年提出了共聚焦显微镜技术的基本原理,获得了美国专利。1971年美国人Davidovits和Egger发明了以激光为光源的共聚焦扫描系统。1978年Sheppard等推出了载物台扫描装置。1980年Koestert等发明了镜扫描系统。从1983到1986年,Aslund和Carlsson等发明了双镜扫描系统和共轭聚焦成像系统。1984年第一台CLSM实用产品问世。进入20世纪90年代后,CLSM系统中逐步引入混合激光和紫外激光技术、计算机控制系统和光子计数技术,使成像的质量和灵敏度都提高了很多,对细胞与分子生物学研究的快速发展起到了很重要的推动作用。

我国目前引进的激光扫描共聚焦显微镜主要来自美国的 Bio-Rad 和Meridian公司，德国的 Zeiss 和 Leica 公司。现以由德国 Zeiss 公司 LSM510 META 激光共聚焦显微镜和美国 Coherent 公司飞秒红外激光器 Mira900 两部分组成的 CLSM 为例来介绍激光扫描共聚焦显微镜的基本原理、主要部件等。

第一节 基本原理

激光扫描共聚焦显微镜是一种用于图像采集和分析的大型精密仪器。它脱离了传统光学显微镜的成像原理，通过在结构上采用双针孔(pinhole)装置，形成物像共轭的独特设计。其基本成像原理如图 15-2 所示。在图 15-2 中，实线(聚焦光线)表示聚焦在观察点的光路，虚线(非聚焦光线)表示的是杂散光光路。激光通过照明针孔，形成点光源，经过透镜、分光镜形成平行光通过物镜聚焦在样品上，并对样品内焦平面上的每一点进行扫描。样品发射光的波长比激发光长，所以它可以通过分光镜，经过透镜再次聚焦，到达探测针孔处，被后续的 PMT 检测器检测到，得到所需的荧光图像。非聚焦光线不能通过探测针孔，从而也不能在 PMT 检测器上成像。

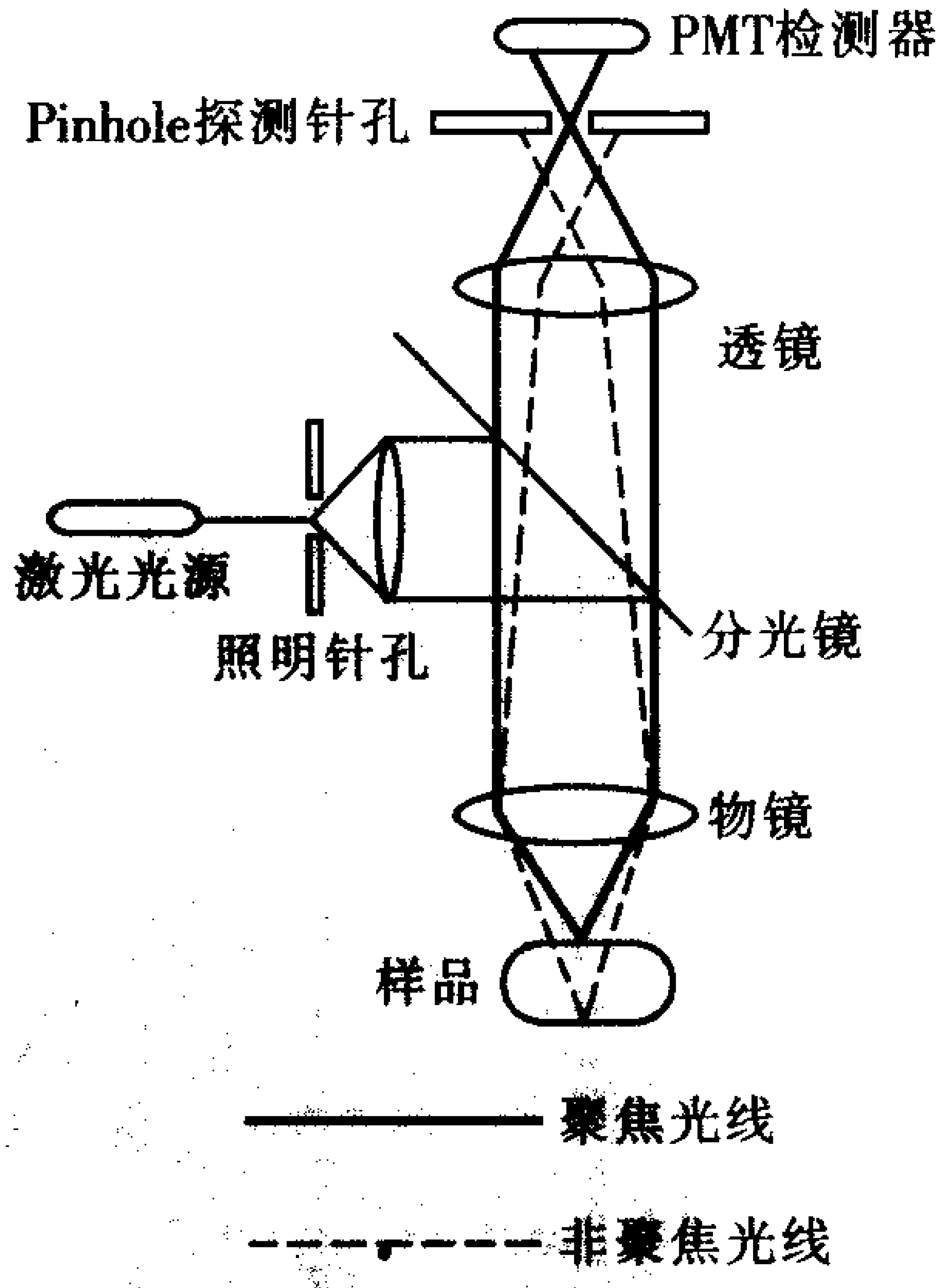


图 15-2 共聚焦成像原理图

因此，由于无特定出射波长的区域在图像上呈现黑色，反差增加，所以成像更清晰。在成像过程中，照明针孔与探测针孔相对物镜焦平面是共轭的，焦平面上的点同时聚焦在两个针孔上，而焦平面以外的点则不会在探测针孔处成像，所以这种双共轭的成像方式叫作共聚焦。如果共聚焦显微镜采用了激光作为光源，就称为“激光扫描共聚焦显微镜”。

在图 15-3 中，通过对样品在 x-y 方向上的逐点扫描，可以形成二维图像。如果调节焦平面在 z 方向的位置，连续扫描多个不同 z 位置的二维图像，则可获得一系列的光学切片图像。通过数字去卷积的方法(deconvolution)可以三维重建出清晰的 3D 图像。正因为 CLSM 能够沿着 z 轴方向，在不同层面上获得该层的光学切片，所以可以得到细胞或组织各个横断面的一系列连续光学切片，实现了“细胞 CT”的功能，如图 15-4 所示。

“共聚焦”概念的引入，颠覆了传统光学显微镜的成像概念。Pinhole 的应用大大提高了图像的分辨率，而且可以将分辨率用像素的方式表述出来。共聚焦显微镜在

放大率上和普通的荧光显微镜相比没有明显优势，但是它对样品细节的成像非常细致清晰。下图为普通光学荧光显微镜与共聚焦显微镜对同一个样品分别进行图像采集的结果，显然，共聚焦技术的应用使得图像更加清晰，如图 15-5 所示。

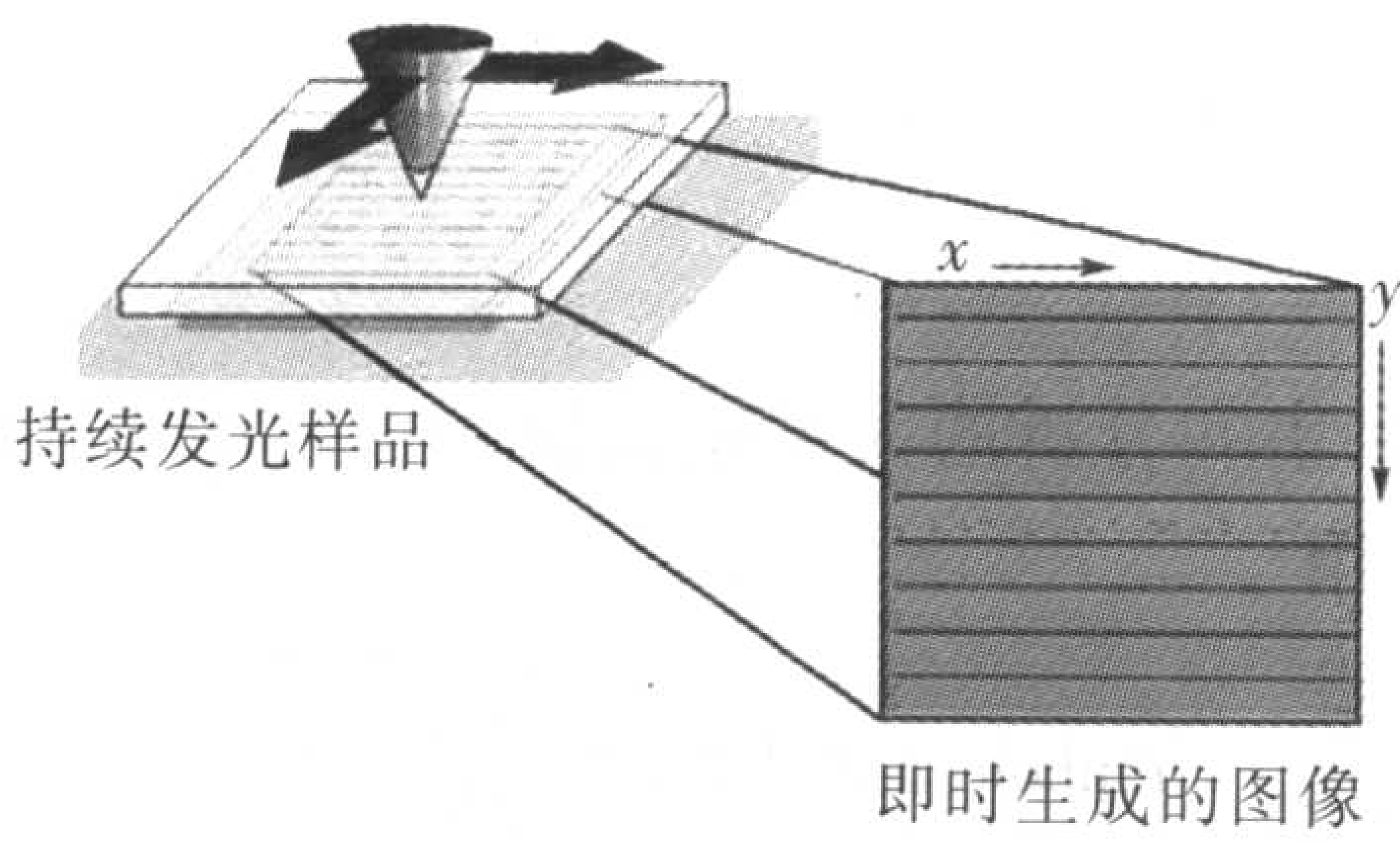


图 15-3 激光对样品焦平面进行 $x-y$ 方向扫描并即时生成图像

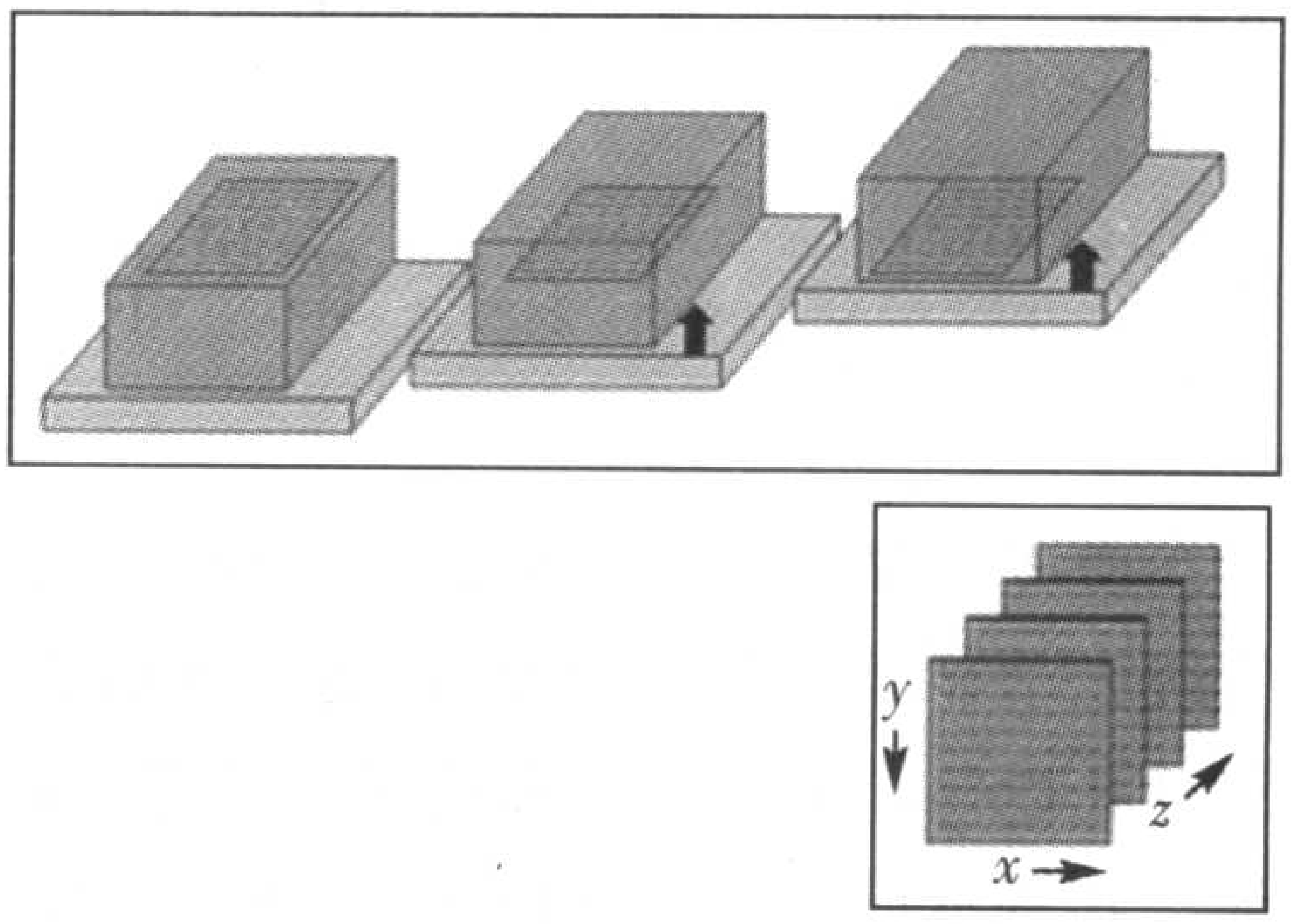


图 15-4 z 轴方向扫描

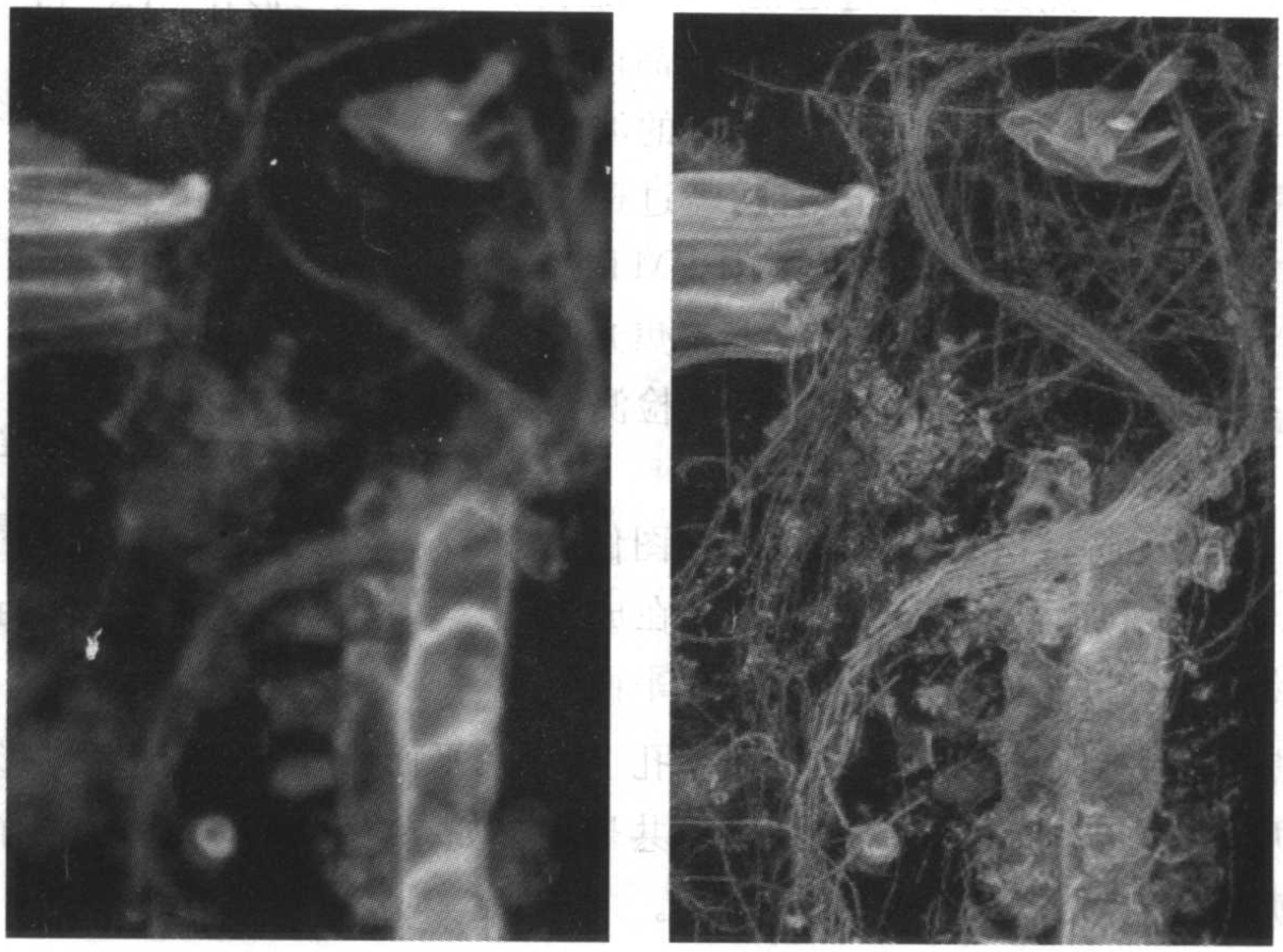


图 15-5 普通荧光显微镜与激光共聚焦显微镜的扫描结果的比较

第二节 主要部件

激光扫描共聚焦显微镜是由作为光源的激光器、荧光显微镜、扫描器以及用来控

制扫描和显示输出的计算机几大部分构成的，如图 15-6 所示。激光作为光源，通过扫描器内的分光镜，得到特定波长的光源，然后进入显微镜的物镜。激发样品后，发射光再次进入扫描器，同样的，经过一系列的元件，最后信号被 PMT 检测器捕捉到。信号输出至计算机内，由计算机对信号进行加工，形成荧光图像。而计算机的另一个重要用途，则是通过步进马达来控制显微镜和扫描器，实现图像采集自动化。

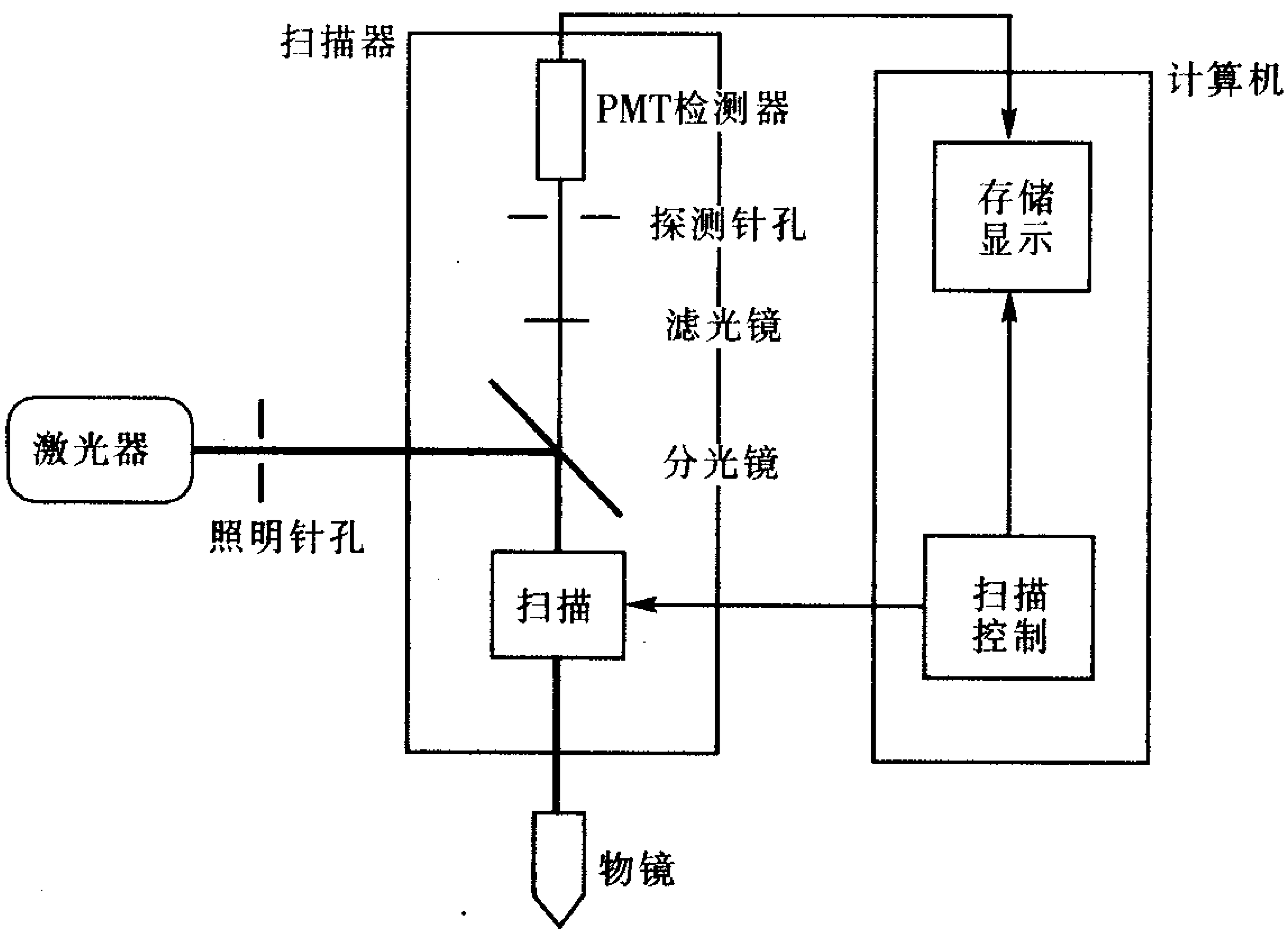


图 15-6　激光共聚焦显微镜结构示意图

下面就激光扫描共聚焦显微镜的各个组成部分来分别进行讲述。

一、激光器

普通光学显微镜使用的光源一般为混合光，光谱范围宽，成像时样品上每个光照点均会因为色差影响以及由照射光引起的散射和衍射的干扰，影响成像质量。

激光由于其特殊的发光机理与激光器的特殊结构而使其具有普通光源所没有的很多优点。共聚焦显微镜要求光源单色性好、亮度高，而激光正好满足这个要求。

1. 单色性好

普通光源通常包含了多种颜色，从波长的角度来看，就是多种不同波长的光的一种混合。单色就要求某种光只能包含一种波长的光，但是这种光在自然界中是不可能存在的。每种光都是有一段波长范围的，如果这个波长的差值 $\Delta\lambda$ 越小的话，就表示单色性越好。激光就可以看作是 $\Delta\lambda$ 非常小的一种光。

单色性好，不仅可以减少色差，而且在仪器设计上也可以简化发射光的单色系统，激发光与发射光易于分离，减少干扰。

2. 方向性好

激光都是相当好的平行光束，发散角度很小。这样可以使能量在空间高度集中。同时，由于它很少发散，所以通过聚焦后，能很好地形成小尺寸焦斑，类似一个点光源。这个光源能够准确地保证样品中特定的点状区域被激发。

3. 亮度高，强度大

这是激光的主要特征。激光的亮度可以比普通光源高出 1 000 多倍。所以，可以在低功率的条件下，激发荧光物质。

4. 相干性、偏振性好

由于受激辐射的光子在频率和振动方向上相同，相位差恒定，偏振状态也是相同的。所以在相干性和偏振性方面，普通光是无法与激光相比拟的。

激光扫描共聚焦显微镜使用的激光光源有单激光和多激光系统。氪氩离子激光器是可见光范围内使用的多光谱激光，发射波长分别为 488nm、568nm 和 647nm 的蓝光、绿光和红光；大功率氩离子激光器是紫外和可见光混合激光器，发射波长分别为351～364nm、488nm 和 514nm 的紫外光、蓝光和绿光。单个激光系统的优点是安装方便，光路简单，但价格较贵并存在不同激光之间的光谱竞争和色差校正问题。

多激光器系统在可见光范围使用氩离子激光器，发射波长为 488nm 和 514nm 的蓝绿光；氦氖激光器发射波长为 633nm 的红光；紫外光选用氩离子激光器，波长为351～364nm。多激光器系统的优点是各谱线激光单独发射，不存在谱线竞争的干扰，调节方便，但光路复杂，光学系统共轴准直调试要求高。

以上所述都属于单光子激光器，1996 年新型双光子激光器问世，利用双光子倍频效应，使用可见光激光来代替紫外激光作激发光源达到检测紫外探针的目的。由于其在成像等方面与单光子激光相比有很多不同，将在本章第八节详细阐述。

二、扫 描 器

扫描器主要由分光镜、滤光镜、检测针孔(pinhole)及 PMT 探测器组成。

分光镜：按照波长来改变光线的传播方向，使激发光能到达样品，而发射光则能通过分光镜进入后续的检测系统。

滤光镜：能够选择出一定波长范围的光来进行检测。

检测针孔：针孔的主要作用在前面已叙述，可以说，没有针孔的概念就没有共聚焦技术。从理论上讲，为了最大程度地去除杂散光的影响，针孔的孔径应该越小越好。但是，为了让荧光信号能够顺利通过针孔，应该在保证图像亮度的情况下，使得针孔尽量小。

PMT 探测器：光电倍增管(photo multiplier tube，PMT)是灵敏度极高、响应速度极快的光探测器。通过调整其电压(或称为增益，detect gain)，可以在一定程度上提高图像的亮度。但是电压也不能调得过高，否则对 PMT 的伤害会很大。

三、荧光显微镜

激光扫描共聚焦显微镜中所用的荧光显微镜与常规的荧光显微镜大体相同，配备有卤素灯透射光源和汞灯光源。同时，它也有自己的特色。比如，通常在显微镜镜体侧面留有接口，与激光光源接驳；由步进马达实现控制；装有光路转换系统，预览时用汞灯作为光源，正式采集图像时用激光作为光源，现在也有可以一边扫描一边观察或者激光扫描和 CCD 成像同时进行的激光扫描共聚焦显微镜。

四、计算机

计算机控制整个 CLSM 系统及电动系统，一切机械上的操作都可以通过它来实现。而且由于共聚焦系统部件繁多，图形采集加工要求高，所以计算机的配置要求通常比较高，尤其是显卡、内存等与图形处理相关的部件，而且都会配备功能强大的软件。

LSM 510 型激光扫描共聚焦显微镜的各项技术参数如表 15-1 所示。

表 15-1　LSM510 型激光共聚焦显微镜各项技术参数

Z 驱动	带光电子码的 DC 马达，最小步径 100nm
精细对焦载物台	HRZ 200，高精密检流（可选项）对焦，总量程 200μm，最小步径 10nm
扫描分辨率	(1×4)～(2 048×2 048)像素，连续可调
扫描速度	每个 512×512 像素的幅面最少 0.4s，512 像素每行最少 1.5ms
检测	同时有最多四个共焦信道，每个都有一个高度灵敏的光电倍增管；一个带光电倍增管的可选发射光信；一个用于测量励磁强度的可选检测二极管
VIS 激光模件	偏光保护单一模式纤维，热稳定可视光 AOTF（光声调协滤光器）用于同时控制 6 个可视光的强度，切换时间<5μs Ar 激光 458，488，514nm，25mW ArKr 激光 488，568nm，30mW HeNe 激光 543nm，1mW HeNe 激光 633nm，5mW
LSM510 控制	控制显微镜、VIS 和 UV 激光模件及扫描模件；通过数字信号处理器（DSP）检查数据获取；通过极宽的 SCSI 控制 DSP 和电脑之间的数据交换
LSM510 软件	用于操作显微镜、VIS 和 UV 激光模件以及扫描模件，用于图像数据读取、演示、处理和档案，3D 功能，4D 功能，多磁道和双向扫描，曲线扫描 操作系统：Windows NT 4.0 可选项： 3D 图像分析软件包“三维 LSM” 生理学数据分析软件 外形 VBA 宏编辑器

第三节　操作步骤及注意事项

激光扫描共聚焦显微镜可以测定的样品种类很多，其中生物样品包括生物材料、组织(切片)、细胞(亚细胞)结构等。样品中荧光的来源主要有如下几种：自发荧光(auto fluorescence)、荧光染色、免疫荧光、荧光蛋白、诱发荧光(induced fluorescence)及酶致荧光(enzymatically produced fluorescence)等。其中，大部分荧光探针的激发波长和发射波长均可在仪器自带软件的染料信息库中找到。

一、样品制备

激光扫描共聚焦显微镜的载物台都设计得比较灵活，可以放置载玻片、培养皿、活细胞观察及灌流系统等多种常见器皿。要根据实验目的、样品种类及形态、物镜的工作距离、所用载物台设置等条件确定样品观察所用的承载方式。常见的器皿有盖玻片、载玻片、培养皿等。

如果仪器配置的是倒置显微镜，应该注意器皿底盘的厚度不能太厚。因为此时激发光要透过器皿的底部才能照射到样品上，由于物镜工作距离的关系，常常无法用高倍镜观察。而且有些塑料皿的底部透光性较差，不利于样品成像。同时，要保证所用器皿洁净、无划痕。

1. 载玻片、盖玻片

一般将盖玻片和载玻片配合使用：在盖玻片上培养贴壁细胞或粘贴组织切片，完成药物反应，进行样品固定和荧光标记等操作。样品处理后将盖玻片扣于载玻片上，使样品置于盖玻片和载玻片之间，上机观察测定。对于悬浮细胞，要在试管中完成样品处理后，在上机前再将其滴于载玻片上，再加上盖玻片，样品封于载玻片和盖被片之间，上机测定。

上机观察时，要根据物镜的工作距离决定用载玻片还是盖玻片靠近物镜镜头。物镜放大倍数越大，焦距越短，则物镜的镜头和样品之间距离(工作距离)也越小。尤其是用高倍油镜(或水镜)观察时工作距离更短，要用盖玻片朝向物镜，镜头要贴到盖玻片上使用时需格外注意，防止镜头被盖玻片磨伤。用低倍镜观察时，载玻片、盖玻片朝向可任意。盖玻片的厚度通常要求在 0.13～0.17mm. 载玻片厚度为 1.0～1.2mm，且厚度要均匀。

载玻片、盖玻片适用于多种样品，例如对细胞(活的或经过固定的贴壁细胞、细胞滴片、甩片)、组织切片、单细胞凝胶电泳片、化工材料等进行形态学观察、静态荧光定量测量、三维重建等。

生物样品经过固定后可以用封片剂进行封片，以防止样品干燥及盖玻片脱落，尤其是对于倒置显微镜来讲。常用的封片剂有甘油＋PBS(9∶1或1∶1)。亦可用指甲油或特殊胶水在盖玻片四周进行涂抹、封闭。而对于活细胞，则可使之悬浮于相应的溶液中，直接滴片和封片，立即观察，不加上述封片剂。

常规的载玻片、盖玻片优点是价钱便宜、易得，使用方便；缺点是载玻片和盖玻片之间可容纳的液体较少，细胞或组织易于干燥，载玻片和盖被片之间容易发生错位，活细胞易被挤压变形，而且一旦封片，则一般不易对细胞或组织做进一步的处理，因此不适合做加药实验和长时间观察活细胞的实验。

2. 培养皿

培养皿(又称 glass bottom dishes 或 coverslip bottom dishes)的结构特点是其在塑料平皿的圆形底部中央打出一个直径 10mm 左右的圆孔，并从平皿底部的外面粘上一片厚度约为 0.17mm 的透光性极好的盖玻片以密封圆孔，配有平皿盖。使用时，将相配套的培养皿支架放到显微镜的载物台，再将载有样品的培养皿放入到该培养皿支架，即可用显微镜观察样品或者用共聚焦显微镜扫描样品。

培养皿兼有平皿和盖玻片的双重优点：其底部的盖玻片为透光性极好的光学玻璃，其透光性比塑料平皿底部的透光性好；底部盖玻片厚度不大于 0.17mm，适用于高倍镜观察和高质量成像；观察时，细胞上方有液体覆盖，不必加盖玻片，因此能够保持细胞等样品不变形、不干燥，保持其原有形态；可以在皿中随时加入或吸出液体，因此，可以随时对细胞进行洗涤、加刺激物等处理，利于保持细胞的生长和实验操作；用倒置显微镜观察细胞时，可以盖着培养皿盖观察，保持细胞的无菌状态，利于细胞培养；节省试剂和细胞，简化操作过程。

与载玻片和盖玻片相比，培养皿的缺点是造价高，体积大，盛装液体后移动时易溅出。

培养皿可用于激光扫描共聚焦显微镜、荧光显微镜、相差显微镜，微分干涉显微镜及偏振光显微镜等。

3. 其他

当观察样品所需放大倍数不高时，也可直接将培养板放在载物台上进行观察、采图。在使用倒置显微镜进行观察时，必须注意器皿底部的厚度，保证光源能够穿透。

进行长时间活细胞观察时，可以采用专门的灌流系统。该系统可不断更新培养基，保持细胞在正常的生长环境内被观察。

二、基本观察步骤及仪器操作

根据实验要求制备好样品后，就可以进行观察了。

（一）开启仪器电源及光源

一般先开启显微镜、激光器，再启动计算机。启动操作软件“LSM510”，设置荧光样品的激发光波长；选择相应的滤光镜组块，以使得 PMT 检测器检测到正确的发射光。

注意：当开启汞灯后，至少工作半个小时后才能关闭，并且要等其冷却（15～20min）后方可再次启动。为了延长汞灯的使用寿命，应尽量减少开关的次数（具体荧光显微镜的操作可参见本书第十四章第二节）。

（二）设置相应的扫描方式

在目视模式下，调整所用物镜放大倍数，在荧光显微镜下找到需要检测的细胞。切换到扫描模式，调整 pinhole 大小和激光强度，得到一个清晰的共聚焦图像。

（三）取得图像结果

选择合适的图像分辨率，再次完整扫描样品后，保存图像结果即可。

（四）关闭仪器

样品检测结束后，先关闭激光器部分，计算机仍可继续进行图像和数据的处理。若要退出整个激光扫描共聚焦显微镜系统，则应该在激光器关闭后，待其冷却过程结束后，再关闭计算机及总开关。

三、获取 3D 图像

前面已叙述过激光扫描共聚焦显微镜具有“细胞 CT”的功能，因此，它可以在不损伤细胞的情况下，获得一系列的光学切片图像。选用“Z-Stack”模式，即可实现此项功能。

第一，开启“Z Stack”选项；

第二，确定 z 轴扫描的起始位置和结束位置，并确立扫描参数；

第三，利用三维重构将得到的样品不同层面的扫描结果重组形成一个三维图像。

四、获取时间序列图像

共聚焦显微镜的“Time-Series”功能，可以自动地在实验者规定的时间内按照设定的时间间隔获取图像。只需选择好所需的时间间隔以及所需的图像数量，开启“Start T”功能键，即可进行实验。

“时间序列”功能大大减轻了实验者的劳动强度，对于荧光漂白恢复，钙离子成像等实验非常实用。

第四节　主要用途

激光扫描共焦显微镜由于其高分辨率、高灵敏度、高放大率等特点，在细胞水平上可做多种功能测量和分析，成为分析细胞学的一项重要研究手段。与传统的光学显微镜相比，它能得到真正具有三维清晰度的原色图像，并可探测某些低对比度或弱荧光样品，直接观察各种生物样品的弱自发荧光，动态地测量 Ca^{2+}、Na^{+}、Mg^{2+} 及 pH 值等影响细胞代谢的各种生理指标，对细胞动力学研究有着重要的意义。同时，激光扫描共聚焦显微镜可以处理活的标本，不会对标本造成理化特性的破坏，以更接近细胞生活状态的参数进行测定。因此，激光扫描共聚焦显微镜常常用于细胞或组织内的分子原位鉴定和定量分析，细胞及亚细胞结构形态学观察以及活体细胞或组织功能的动态监测，在生命科学领域的分子水平、细胞及组织水平的研究中得到广泛应用。

激光扫描共聚焦显微镜主要的应用包括以下几个方面：

一、细胞物理和生物化学测定

CLSM 可进行重复性极佳的低光探测及活细胞荧光定量分析。利用这一功能既可对单个细胞或细胞群的溶酶体、线粒体、DNA、RNA 和受体分子等细胞结构的含量、成分及分布进行定性、定量及定位测定，还可测定诸如膜电位和配体结合等生化反应程度。高灵敏度、快速的免疫荧光测定可以准确监测抗原表达、细胞结合和杀伤及定量的形态学特性，以揭示诸如肿瘤相关抗原表达的准确定位及定量信息。另外，还可以对细胞的面积、周长等参数进行自动测定。

二、激光扫描共聚焦图像分析及三维重组分析生物结构

借助激光扫描共聚焦系统，可以获得生物样品高反差、高分辨率、高灵敏度的二维图像；可得到完整的细胞及组织的一系列光学切片，从而得到各层面的信息，三维重建后可以揭示亚细胞结构的空间关系。使用工具软件可进行三维图像重组，各光学切片被组合成三维图像，并可从任意角度观察，也可以借助改变照明角度来突出其特征，产生更生动逼真的三维效果。

三、动态荧光测定

利用 Fluo-3、Indo-1、Fura-Rad 等多种荧光探针，激光扫描共聚焦显微镜可迅速

对样品的点、线、面进行扫描，测量单次、多次单色、双发射和三发射光比率，从而对单个细胞内离子(Ca^{2+}、K^+、Na^+、Mg^{2+}等)及pH值等的动态变化做实时定量分析；可以定量探测胞内Ca^{2+}对肿瘤启动因子、化学因子、生长因子及各种激素等刺激的反应；使用双荧光探针Fluo-3和SNAF可同时测定Ca^{2+}和pH值。也就是说，利用激光扫描共聚焦显微镜能进行细胞生理信号的动态监测。

四、荧光光漂白恢复——活细胞的动力学参数

荧光光漂白恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching，FRAP)借助高强度脉冲式激光照射细胞某一区域，从而造成该区域荧光分子的光淬灭，该区域周围的非淬灭荧光分子将以一定速率向受照区域扩散，可通过低强度激光扫描探测此扩散速率。结合仪器所带的time series功能可测量分子扩散率、恢复速度，并由此而揭示细胞结构及相关的机制(具体参见本章第六节)。

五、胞间通讯研究

动物细胞中由缝隙连接介导的胞间通讯被认为在细胞增殖和分化中起非常重要的作用。CLSM可用于测定相邻细胞间通讯，测量由细胞缝隙连接介导的分子转移，研究肿瘤启动因子和生长因子对缝隙连接介导的胞间通讯的抑制作用，以及胞内Ca^{2+}、pH值和cAMP水平对缝隙连接的调节作用。

六、检测荧光共振能量转移

荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer，FRET)是指，当两个荧光基团靠得非常近时(一般小于10nm)，其中一个基团(供体)的发射光可以用来激发另一个基团(受体)(具体参见本章第六节)。这种现象可以用于证实携带不同荧光基团的两个分子靠得很近。CLSM检测FRET具有独特的优势，利用其激光光源激发供体，多通道同时检测双重(或多重)荧光信号，并利用时间扫描程序检测荧光信号在二维及三维空间的变化，利用其软件得到定量测定曲线和数据。

七、细胞膜流动性测定

荧光膜探针受到极化光线激发后，其发射光极性依赖于荧光分子的旋转，而这种有序的运动自由度依赖于荧光分子周围的膜流动性，因此极性测量间接反映细胞膜流动性。这种膜流动性测定在膜的磷脂酸组成分析、药物效应和作用位点。温度反应测定和物种比较等方面有重要作用。有些生产共聚焦显微镜的厂商设计了专用的

软件用于对细胞膜流动性进行定量和定性分析。

八、笼锁-解笼锁测定

许多重要的生活物质都有其笼锁化合物，在处于笼锁状态时，其功能被封闭，而一旦被特异波长的瞬间光照射后，光活化解笼锁，使其恢复原有活性和功能，在细胞的增值、分化等生物代谢过程中发挥功能。利用 CLSM 可以人为控制这种瞬间光的照射波长和时间，从而来控制多种生物活性产物和其他化合物在生物代谢中发挥功能的时间和空间。

九、粘附细胞分选

美国 Meridian 公司的 ACAS ULTIMA312 是目前对粘附细胞进行分离筛选的分析细胞学仪器之一，它对培养皿底的粘附细胞有两种分选方法：

(1) Coolie-Cutter TM 法，该方法是 Meidian 公司专利技术，它首先将细胞贴壁培养在特制培养皿上，然后用高能量激光将欲选细胞四周切割成八角形几何形状，而非选择细胞则因在八角形之外而被去除，该分选方式特别适用于选择数量较少的细胞诸如突变细胞、转移细胞和杂交瘤细胞，即使对百万分之一机率的细胞也非常理想。

(2) 激光消除法，该方法亦基于细胞形态及荧光特性，用高能量激光自动杀灭不需要的细胞，留下完整活细胞亚群继续培养，此方法特别适于对数量较多细胞的选择。

十、细胞激光显微外科及光陷阱技术

CLSM 可将激光当作“光子刀”使用，借此来完成诸如细胞膜瞬间穿孔、切除线粒体、溶酶体等细胞器、染色体切割、神经元突起切除等一系列细胞外科手术。有些共聚焦系统带有光阱功能，从而可以移动细胞的微小颗粒和结构，该新技术广泛应用于染色体、细胞器及细胞骨架动力学研究。

十一、生物芯片(biochip)

生物芯片又称为 DNA 微阵列，是 20 世纪 90 年代中期发展起来的一项尖端技术。它以玻片、硅为载体，在单位面积上高密度地排列大量的生物材料，从而达到一次试验同时检测多种疾病或分析多种生物样品的目的。基因芯片、蛋白芯片等都属于生物芯片的范畴。所有的微阵列上的生物材料发射的荧光须经扫描装置来分析荧

光强度和分布，在这些装置中，激光共聚焦扫描系统具有优越的性能，能获取高质量的图像和数据。

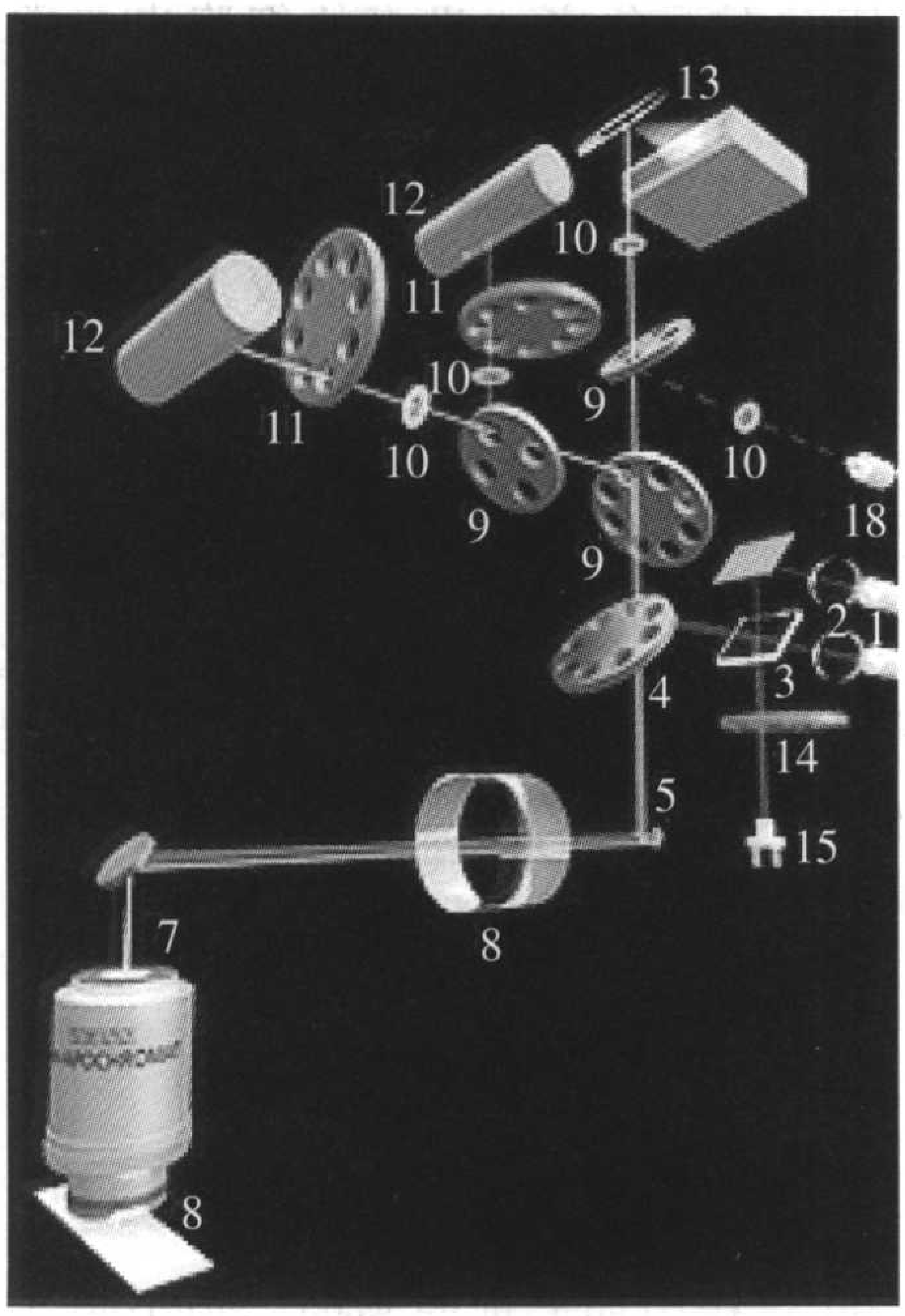
第五节　LSM 510 META

复杂生物体包含许多重要细节，为了理解这些物体之间的关系，需要将这些复杂物体连同这些重要细节一起记录下来。同时，把记录所需要的时间降到最短是非常关键的。

META 这一名称是指激光扫描显微镜学中的一个新量纲。根据共聚焦原理和多针孔概念，该系统理想地将成熟的 LSM 510 智能技术与 META 探测功能结合起来。可以方便高效地进行目前最先进的动态细胞分析，如 FRET、FRAP、FLIM 等，为生命科学研究提供了更加灵活多样的方法。

一、LSM 510 META 的扫描模件

图 15-7 所示的独特的扫描模件是 LSM 510 META 的核心。它含有电动准直仪、扫描镜、单独可调节和可定位的针孔和高度敏感探测仪（包括 META 探测仪）。所有这些元件用来保证最佳的标本照明和对反射光或发射光的有效收集。高效光栅以一种新型的方式将 META 探测器中的发射荧光分离开来。它将整个荧光光谱投射到 META 探测器的 32 个通道上。这样，扫描图像的每一个像素均可获取光谱识别标志，然后可用来进行数码分离成数字信号。



1 光纤　2 电动准直仪　3 光束合并仪　4 主二色光束分离器　5 扫描镜　6 扫描镜头　7 物镜镜头　13 高效光栅

图 15-7　META 扫描模件

二、LSM 510 META 的优点

META 检测的概念：META 荧光显微镜系统能比其他显微镜更自由地设计试验，并且能获得清晰的结果，对图像和数据进行可靠的定性定量分析。

迄今为止，在一个标本内要将两个荧光标记的辐射清楚地分离开来是比较困难

的。如果标记更多，所产生的问题就更复杂。通常情况下，可提供的颜料的光谱性能限制了实验的自由程度。LSM 510 META 独特的发射指纹技术不再需要用滤光镜或其他方法来确定检测光谱带。采用此项技术，只需要三个简单步骤就可以在很大范围内将重叠发射光谱分离开来。

第一，将标本的光谱标记自动地记录在一套图像——λ 图库中。

第二，用 ROI 功能确定荧光标记的参照光谱，还可以将它们保存在 LSM 图谱数据库中用于以后的试验。

第三，执行“线性分离”功能，这样可以在参照光谱的基础上快速、方便、确切、清楚地将荧光信号分离开来。

如果再增加一只 META 检波器就可采用“后续跟踪”进行检测波带的快速电子转换。这样就可以检测到重叠发射波带，从而大大改善信号输出。采用这些功能，LSM 510 META 可以以全新的方式处理实验对象，对各种荧光信号进行清晰地识别，有效地获取图像。这是要获取可靠结果的基本要求，即使许多染料混合在一起也是一样；而到目前为止，还没有其他技术可以用来进行这种分离。

LSM 510 META 一直保留着在 LSM 510 中首创的多真空概念，并将这一概念应用到 META 检波器中。与其他检波器一样，META 检波器有自己的电动共焦针孔，可以通过 LSM 软件方便地加以控制。

通过调节这一针孔位置和直径可以得到适合所需要的探测波带。这一方面保证了由标本所发射或反射的光尽可能被完全捕获；另一方面，同时使用各种检波器，多标签标本的荧光信号可以从同一平面上被收集起来。在以最佳信噪比的三维构建实验中，这种能力对结果来说是至关重要的。

正因为 META 有着如此多的卓越之处，所以在研究中，它的优势是其他类似系统无法比拟的：

第一，LSM 510 META 的各种功能为研究提供了众多的新途径，不受现有系统的限制。现在可以非常容易地对那些随着时间和细胞内部不同工作过程而改变其光谱特征的染料进行研究，如 FRET 对各种离子指示剂。大范围重叠的放射光谱，如 CFP、GFP、YFP，甚至是 GFP 和 FITC，以及那些目前还无法分辨成分的混合染料现在可以被分离开来了。

第二，LSM 510 META 可以适应不同的应用要求和各种用户的环境特制，其扫描方式可以对具体的不同问题提供相应的解决方案。除了各种获取模式，还可以使用其多种功能进行有效地定性或定量分析，制作文件并存档。LSM 图像数据库不但能保存图像而且能保存用来获取图像的系统参数。只要用鼠标在 ReUse 键上点击一下，就可以恢复这些参数，从而在任何时候以相同的条件重复试验。基于这种灵活性，LSM 510 META 构筑了一个可应用于任何生物医学研究的工作站。

第三，制造商可以为用户提供一个由完全匹配的部件构成的系统，即这些部件可以根据需要先合并起来，以后再扩展。已经安装了 LSM 510 的系统只要对现场的新

检波模件改型便可以随时被转换成 LSM 510 META。现有的光学、机械、电子界面和接口还可以逐渐扩大功能从而实现其他测量方法。如采用荧光相关光谱(FCS)、多光子显微或者荧光寿命成像显微(FLIM)对分子的相互作用进行测量。只要对软件进行升级，就能很容易地获取新的扫描和分析方法。

三、LSM 510 META 的操作过程

采用 LSM 510 META 的发射指纹，可将复杂的荧光信号分离(即使采用大范围重叠的发射光谱)。它由三个步骤构成：

步骤 1：采用 λ 存储栈来获得完整的荧光发射。获取一个 λ 存储栈来记录标本的光谱特征，这个步骤在最小时间内完成，它不但对娇贵的标本伤害很小，而且可以可靠地捕获到快速的动态过程。如彩图 48 所示(见彩页 15)。

步骤 2：采用 Mean-of-ROI 来确定参考光谱。采用 Mean-of-ROI 功能来确定参考光谱，这种参考光谱可以被储存在 LSM 510 META 的光谱数据库内，用来进行后续的实验。如彩图 49 和彩图 50 所示(见彩页 15)。

步骤 3：进行"直线混合成分分离"。采用标本中的每个荧光标识的整个发射光谱，"直线混合成分分离"功能即可通过智能规则系统对混合信号进行一个像素一个像素地分离。作为结果，即使是重叠很大的发射光谱，如 GFP 和 FITC 发射光谱，都能安全地被分离，宽带自发荧光可以被可靠地除去。采用全新的发射指纹法解决了本来不可解决的信号重叠问题。如彩图 51 和彩图 52 所示(见彩页 16)。

第六节　其他用途

一、FRAP/FLIP

FRAP(光漂白后荧光恢复)即为在光漂白后观察样本特定区域中的荧光恢复情况。FRAP 是由没有漂白的荧光团由周围进入漂白区引起的，可以用来测量稳定分子在特定区域的运动特性。分子运动包括细胞膜上或者细胞内荧光标记的分子的扩散、转移或其他类型的运动。

FRAP 原理：如图 15-8 所示，在进行 FRAP 实验时，一个区域(如用荧光标记的细胞表面)先用低强度激光成像，然后用高强度激发光脉冲对指定区域进行强烈扫描漂白，如衍射限制点、小漂白 ROI、视场内平行光带的直线型。最后，在漂白区域的恢复过程中采用 time series 模式用低强度激光成像。



图 15-8 FRAP 实验原理

FRAP 的恢复时间(或半恢复时间)可说明荧光分子运动(如被动的扩散或分子自发积极的移动)的运动特性,如扩散速度等量纲。

FLIP(光漂白中的荧光损失)是指一个局域被重复漂白后,与其相邻的另外一个指定区域内荧光的减少或消失。与 FRAP 一样,FLIP 被用来测量细胞膜或活细胞内分子运动的力度。

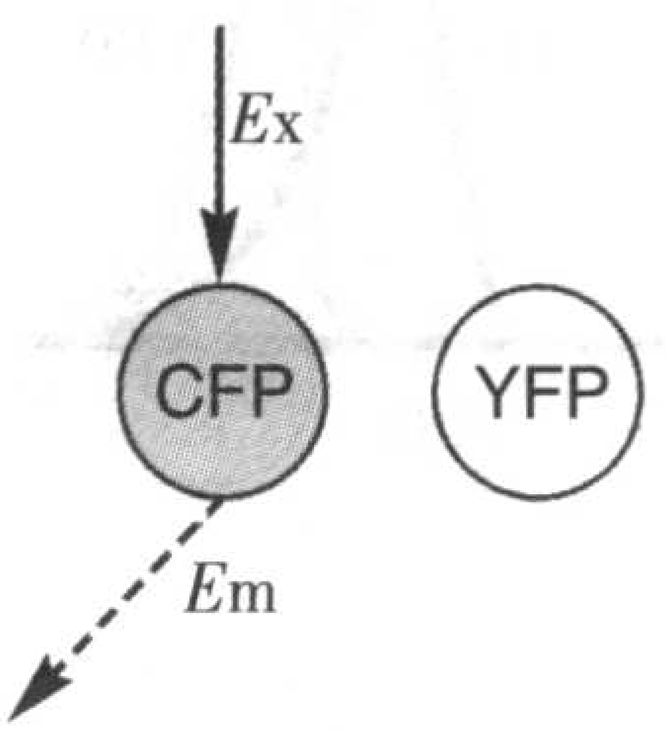
二、FRET

蛋白质或其他分子在活细胞内互相结合的时间和地点是了解它们功能的关键问题。要回答这一问题,需要将蛋白质标上不同的荧光基团。但是,光学显微镜由于受到光学分辨率的限制,因此其对蛋白质的探测精度只能在 0.2μm 左右。要研究蛋白质成分的相互物理作用,需要较高的分辨率。

采用 LSM 510 META 可进行荧光能量共振转移试验——FRET。

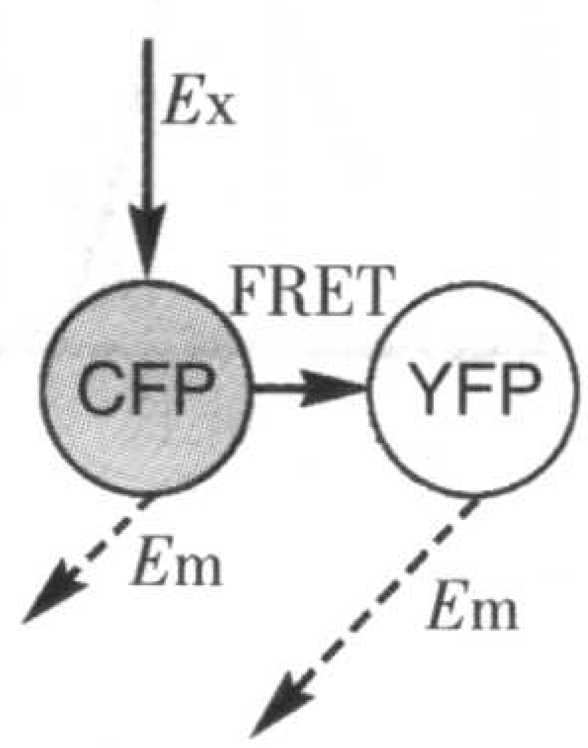
(一) FRET 原理

FRET 就是采用非放射性方法,在供体和受体相互靠得很近时(1～10nm),将光子能从一个受激励的荧光团(供体)转移到另一个荧光团(受体)。如图 15-9 和图 15-10所示。采用 FRET,可以解决超过光学显微镜光学显微限度的分子相对邻近度问题,诸如:



CFP 受激发光激发后便发射荧光。此时 CFP 离 YFP 的距离比较远,约为 10nm 或 10nm 以上。YFP 没有受到光激发,因此也不发射荧光

图 15-9 受体与供体慢慢靠近



CFP 受激发光激发,而且此时 CFP 与 YFP 非常接近(1～10nm)。于是 CFP 将能量转移到 YFP 中,从而使得没有直接受激发光激发的 YFP 发射荧光,而 CFP 本身的发射光将变弱

图 15-10 光子能量慢慢转移

(1) 两个蛋白质间的分子相互作用；

(2) 一个分子内部(如酶活动能力、DNA/RNA 形态)的结构变化；

(3) 像 CFP-YFP Cameleon 这样特别的 FRET 工具的离子浓度。

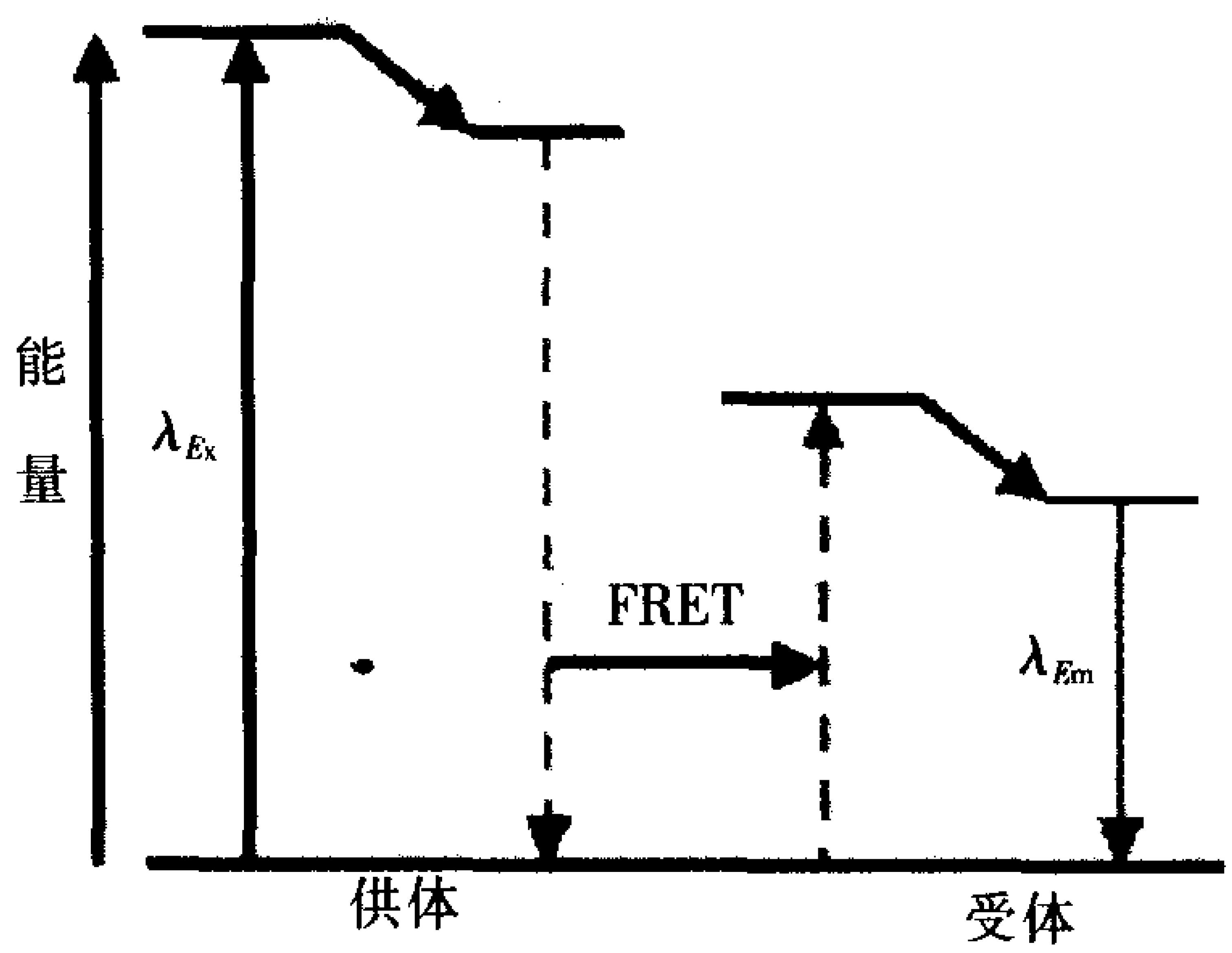


图 15-11 CFP/YFP FRET 能量图

受激发后的荧光团(供体)将受激发的电子转移到另一个荧光团(受体)，这种能量的转移是非放射性的，主要是供体和受体之间的偶极—偶极间的相互作用。目前只发现有少数几个荧光基团对适合进行 FRET 实验。因为，除了其他必要条件(如偶极子定向、足够的荧光寿命)，供体发射光谱还必须将受体的激发光谱重叠起来，如图 15-11 所示。常见的 FRET 对是 CFP/YFP、BFP/GFP、GFP/Rhodamine、FITC/Cy3。

(二) 采用荧光蛋白质的 FRET

像绿色荧光蛋白质(GFP)这样的荧光蛋白质(FPs)对 FRET 实验非常有帮助。它们可以以基因方法融合到有关蛋白质中去并且在细胞中表达，使它们成为蛋白质在活细胞中本地化的极好报告系统。绿色荧光蛋白可以提供不同光谱特性的增强型 FP 变异。

用青色的 CFP 作供体、黄色的 YFP 作受体是最适合做活细胞 FRET 实验的，因为 CFP 发射光谱部分重叠了 YFP 激发光谱，如图 15-12 所示。

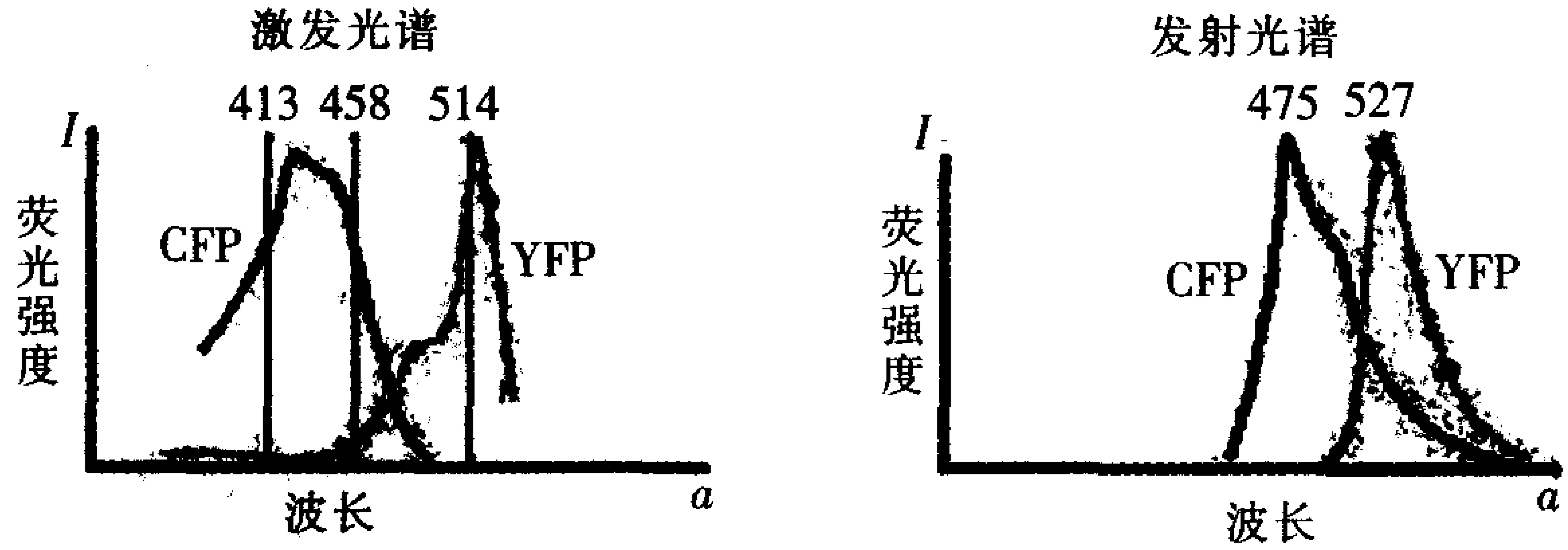


图 15-12 CFP/YFP 光谱图

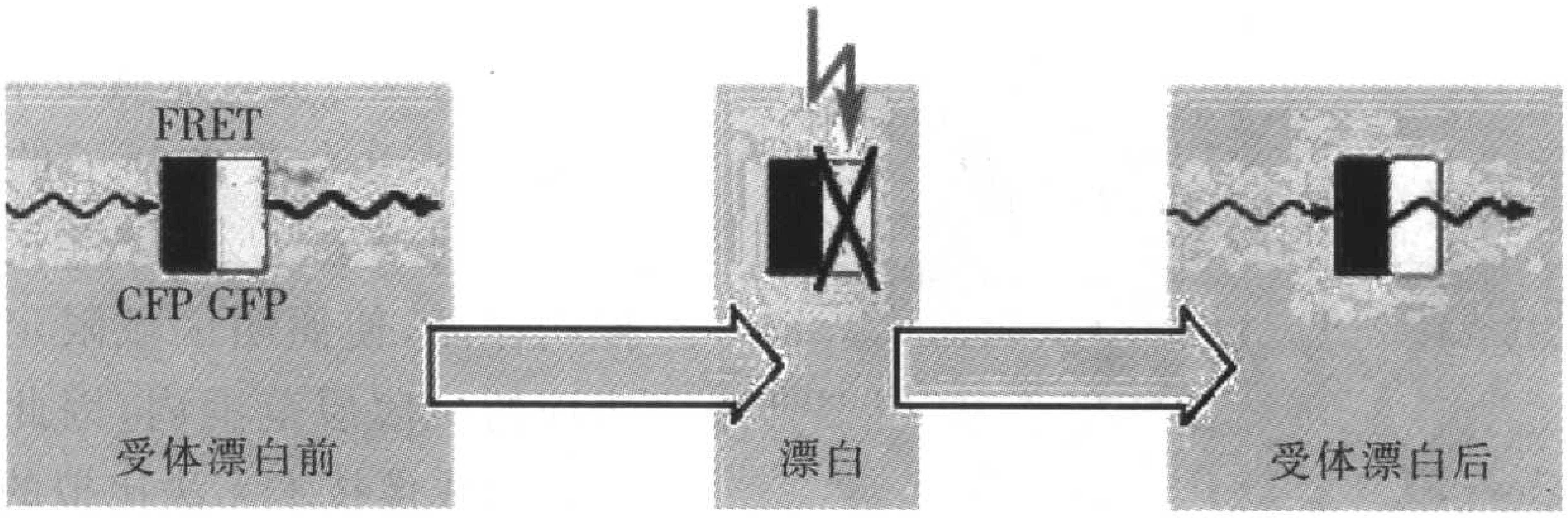
CFP(供体)受到激发，但是大多数能量不会引起青色发射光，而是被传送到 YFP(受体)，因此所产生的发射光主要是黄色的。

(三) 检测 FRET 的方法

目前有几种不同的方法用来检测 FRET。所有这些方法都可以用 LSM 5 PASCAL 或 LSM 510 来进行。

普通滤光镜 FRET：对供体、受体和 FRET(供体激发和受体发射)采用单独的滤光镜/放射带配置来获得相应的图像或时间系列。如果采用 FRET，供体信号减弱，受体和 FRET 信号增强。

受体漂白：利用供体、受体光路配置来获取单独的图像或时间序列。如果采用 FRET，受体漂白后，供体信号增强。如图 15-13 所示。



FRET(受体漂白前)：供体信号减弱，受体增强

FRET(受体漂白后)：无受体，供体信号增强

图 15-13 FRET 原理

在 LSM 510 META 共聚焦系统中，Zeiss 公司引进了一种全新的方法使 FRET 实验更加方便可靠，也使得 LSM 510 META 对 FRET 实验更加理想。"Lambda 图库"的放射指纹和用于荧光信号清楚分离的"线性分离"保证了较大的动态范围和较好的信噪比，从而使 FRET 检波敏感度比普通检测方法更高。

第七节 应用于激光共聚焦的新技术

在共聚焦技术的发展过程中，单一的共聚焦技术已经不能满足当今实验的需要。于是出现了整合在共聚焦技术上的一些其他手段。这些新技术在一定程度上弥补了共聚焦技术的不足，两者的结合应用使得成像技术更加完善。

一、TIRFM

自从 1998 年 OLYMPUS 推出了世界上第一台商业用全内反射荧光显微镜(total internal reflection fluorescence microscopy，TIRFM)以来，这种非常特殊的光学技术目前已经被细胞生物学家和神经科学家广泛应用，使用该技术可以用于单分子观察和细胞膜相关研究。

如图 15-14 所示，TIRFM 技术依赖于斜射光线在两种不同折射率光学介质表面产生的极浅的隐失波。该效应产生的条件是入射介质折射率大于折射介质，并且斜射照射到光学界面时入射角大于全反射临界角。残余的隐失波扩散进入低折射率介

质，并且随着扩散深度的增加，光强成指数递减。利用隐失波极浅的穿透性，可以在光学表面100nm以内照明和激发荧光染料，因此几乎完全排除了细胞体内的自发荧光干扰，与传统荧光照明技术相比，极大地改善了图像的信噪比。

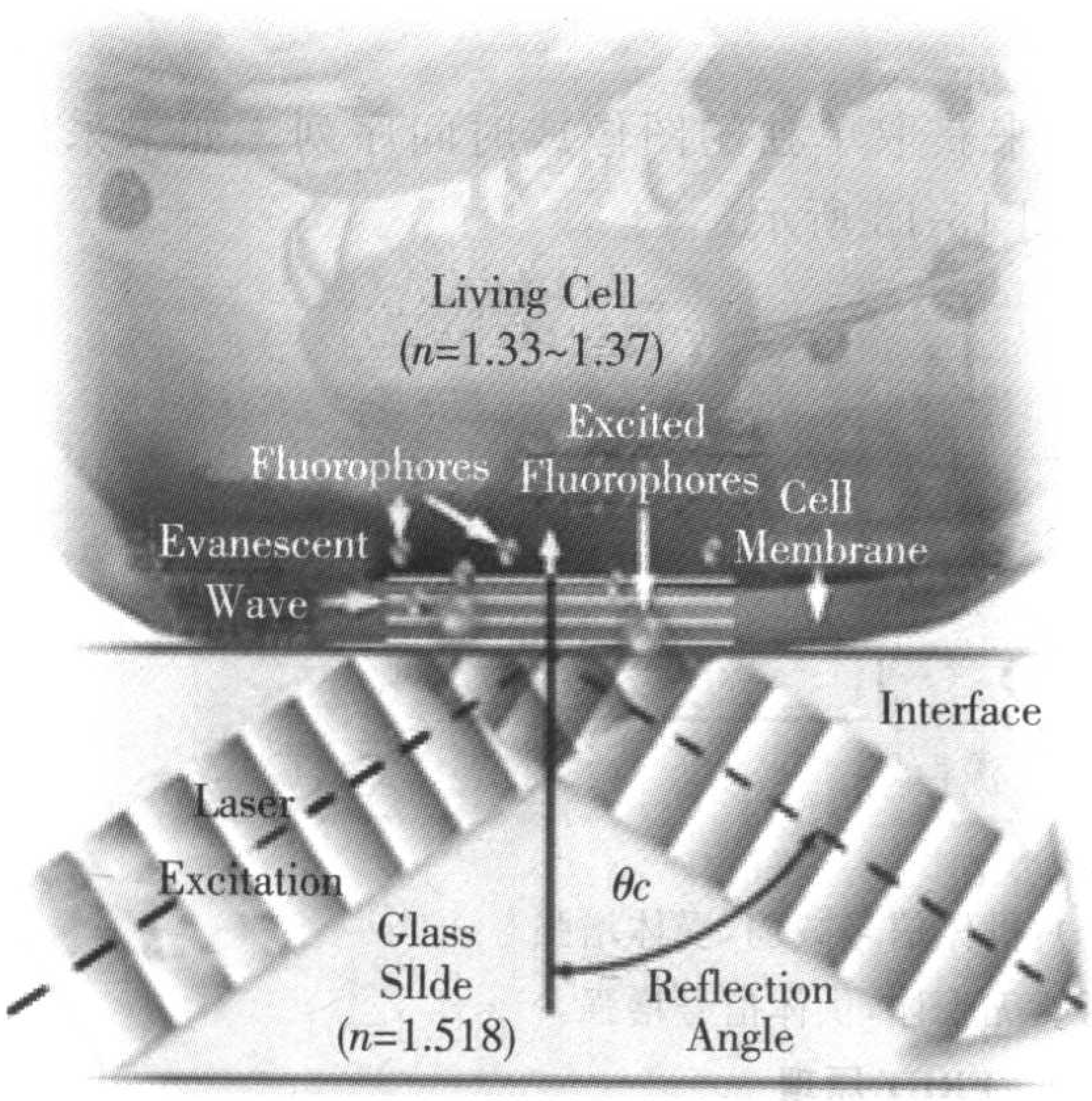


图 15-14 TIRFM 原理

全内反射荧光显微技术可以用来实现对单个荧光分子的直接探测。它利用全内反射产生的隐失波照明样品，使照明区域限定在样品表面的一薄层范围内，因此具有其他光学成像技术无法比拟的高信噪比和对比度，近年来已被生物物理学家们广泛应用于单分子的荧光成像中。

在光的折射和反射过程中，如果光束以大于临界角的角度入射到液体介质中，光束会全部反射回玻璃中。根据经典几何光学原理，光发生全反射，光会在玻璃界面上完全反射而不进入液体溶液中，那么它不会对细胞进行照明。而实际上，光具有波粒二相性，由于波动效应，仍然会有一小部分能量穿透到液体介质中，这就是所谓的隐失波。在“近场”情况下，光沿平行界面传播。这种“隧穿效应”可以通过绝缘介质表面的电磁场麦克斯韦方程组来解出。由全内反射产生近场激发照明之后，利用共聚焦或宽场去取像，即构成荧光标记全内反射荧光显微镜。全内反射显微成像是采用隐失波照明。隐失波的特点是在平行界面方向以行波场方式传播，在垂直界面方向则是一个指数衰减场。所以这种显微成像技术成像的视野开阔，同时探测样品的厚度却很薄，约为100nm级，可以将背景光减小到极低的水平。

全内反射应用的核心问题是制作与电子显微术切片尺寸相当的光学切片。与共聚焦技术相比，单光子或双光子的共聚焦系统层析深度分别为约500nm和约800nm，而全内反射显微术典型的垂直照明深度小于100nm。这么薄的光学切片意味着信噪比比共聚焦系统好得多，细胞的光损伤和光漂白也很小。此外TIRFM图像是通过电荷耦合器件CCD相机来捕获的。这种仪器很灵敏，成像速度很快(很少有CCD相机兼有以上两个优点)，目前可达到的量子产率已到80%，成像速率约200Hz(帧/s)。当对活细胞成像时，为了达到单分子级的灵敏度或是为了减少曝光时间，需要采用图像增强器。

但是，TIRFM并不是万能的。共聚焦显微镜能够对细胞和光漂白区域进行深度三维成像。实际上，TIRFM不可能做到深度层析成像，它是一种后补成像方法，

它可以和别的显微术结合起来，例如明场显微术、荧光显微术、共聚焦显微术、原子力显微术和荧光寿命成像显微术等，达到特殊要求的成像效果。

二、多扫描模块系统

这种系统显著的特点就是应用两束激光进行刺激和扫描成像同步的双扫系统(SIM Scanner)。当一束激光对样品进行刺激的同时，另一束激光同时采集到高分辨率的图像。提供刺激的激光与进行扫描的激光共同为FRAP、FLIP和光转化实验提供理想的实验平台。

Olympus FluoView FV1000共聚焦显微镜正是这种新型的点扫描、点探测共聚焦显微镜。除了双扫系统外，该系统用高效离子沉积镀膜技术的滤光片，增加了系统的灵敏度，同时高速的扫描振镜与光谱分光检测装置的结合，使光谱成像的分辨率可以精确到2nm。它能够对多染标本进行多达四个通道的荧光采集成像。在该系统中，波长选择和激光强度控制方便灵活，采用先进的声光可调滤波器(AOTF)技术，最大程度地简化了激发波段的选择，有效地避免了标本的荧光衰减和不同染料荧光的光谱交叉干扰，因此减少了成像过程中对活细胞的损伤，同时满足了活细胞对成像系统提出的高速度与高敏感度的要求。

三、弧光灯光源的圆盘扫描系统

Olympus DSU(Disk Scanning Unit，转盘扫描单元)是对转盘式扫描共聚焦的突破性改进，当该转盘以3 000rp/s的速度旋转时，其上的狭缝条纹会形成虚拟的共聚焦针孔(pinhole)。这种功能设计平衡了共聚焦性和高光通量，所以该系统可以使用弧光灯作为光源，提高更佳信噪比，而且与激光共聚焦显微镜相比，荧光染料激发光的选择范围更广泛。DSU可以同时适用于正置显微镜和倒置显微镜，与电动显微镜搭配组成理想的电动Z-层叠图像、3D图像分析系统。同样，正置水浸式电生理显微镜及全系列的水浸式物镜都适用于该系统。

该系统的特点和优点：

(1) 可以在最小能量的激发光下高速获取图像，因此十分适于活细胞研究。

(2) 通过计算机可以全自动地控制扫描盘进出光路和通过内置滤光镜转换器滤光片，操作十分容易。DSU可以选择5种不同宽度狭缝和间隔的转盘，在不同数值孔径物镜和不同厚度标本下都可以获取最优化的图像。

(3) 适用于紫外荧光激发。DSU的优化设计可以非常理想地应用于350nm激发光，同时从近紫外到近红外都可以提供极佳的性能。DSU可以使用标准的Olympus激发块作为激发系统。

(4) 可以获取从10×到100×的共聚焦图像。

(5) 方便切换共聚焦光路。

(6) 照明系统内置视场光阑,可以有效地控制照射标本范围。

第八节 双光子(多光子)激光扫描显微镜

一、单光子激光扫描共聚焦显微镜的局限

在进行生物样品的研究工作中,单光子激光扫描共聚焦显微镜有很多局限和问题。比较突出的有以下两点:

1. 记染料的光漂白

因为 pinhole 必须足够小以获得高分辨率的图像,而 pinhole 过小又会阻挡掉大部分从样品发射出来的荧光,包括从焦平面上发出的荧光。相应地,激发光必须足够强以获得足够大信噪比,而高强度的激光会使染料在连续扫描的过程中迅速褪色。通常,荧光信号会随着扫描进程的进行变得越来越弱。

2. 光毒作用

在激光的照射下,许多荧光分子会产生诸如单态氧或自由基等细胞毒素,所以实验中要限制扫描时间和激发光的功率密度以保持样品的活性。

因此,双光子(多光子)共聚焦技术便应运而生。

二、双光子(多光子)激光理论基础

虽然单光子吸收的作用几率最大,但是如果 n 个低能量(长波长)光子同时到达,并且满足以下等式,就可以以一定的几率激发分子:

$$(E_1-E_0)=h_c(1/\lambda_1+1/\lambda_2+\cdots+1/\lambda_n)$$

式中,(E_1-E_0) 是激发分子所需的能量;$\lambda_1,\cdots,\lambda_n$ 是单个光子的波长。如,NADH 酶在 350nm 的光激发下产生 450nm 的荧光,而在双光子激发情形下,需同时吸收两个 700nm 的光子才能产生 450nm 的荧光。

双光子吸收几率比单光子小得多,与光强的平方成正比。光强表示单位面积上的光功率,因此,具有高峰值功率和高聚焦能力的超短脉冲激光器是理想光源。图 15-15为该种激光器发出的飞秒(fs)激光示意图。

飞秒激光是一种以脉冲形式运转的激光,持续时间非常短,只有几个飞秒,一飞秒就是 10^{-15}秒。它比利用电子学方法所获得的最短脉冲要短几千倍,是人类目前在实验条件下所能获得的最短脉冲,这是飞秒激光的第一个特点。飞秒激光的第二个特点是具有非常高的瞬时功率,可达到百万亿瓦,比目前全世界发电总功率还要多出

百倍。飞秒激光的第三个特点是，它能聚焦到极小的空间区域，从而使电磁场的强度比原子核对其周围电子的作用力还要高数倍。

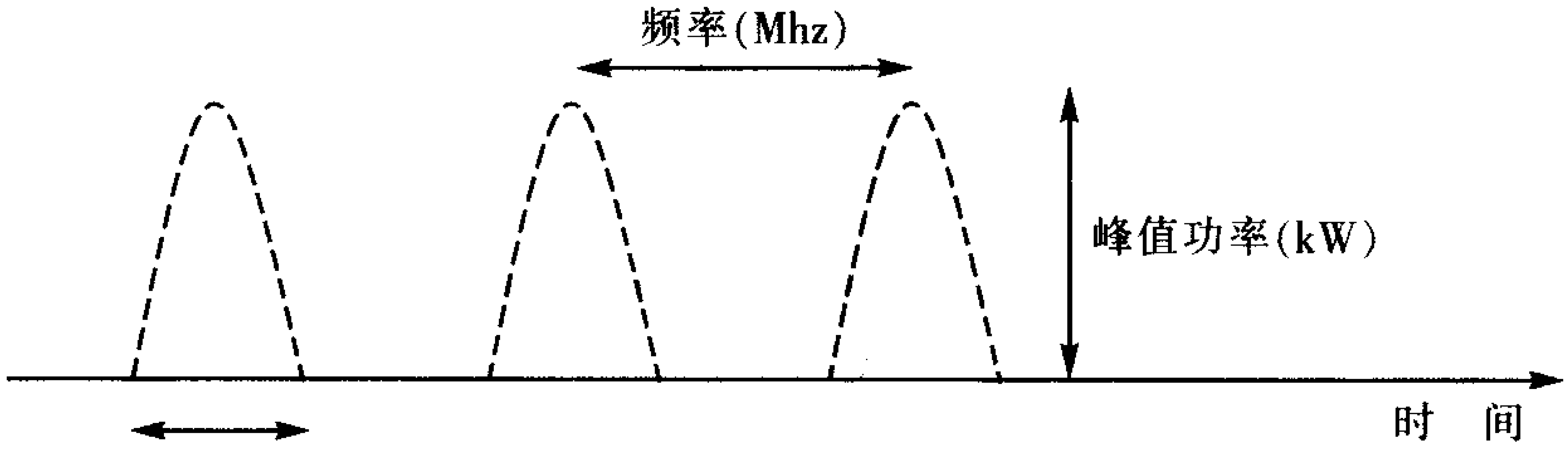


图 15-15　超短脉冲激光波形

三、双光子(多光子)激光成像原理

如图 15-16 所示，单光子和双光子激光分别聚焦在样品上。

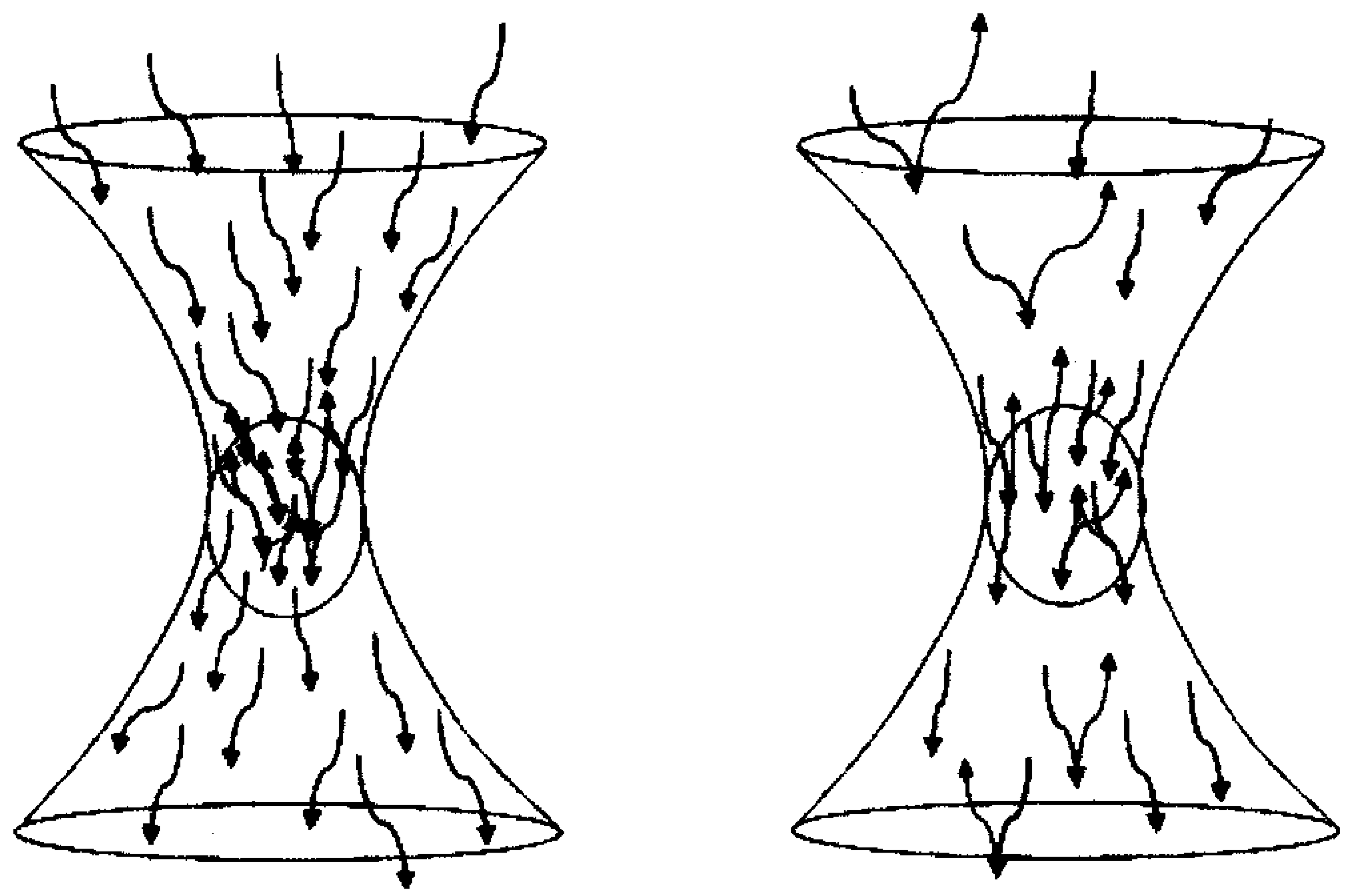


图 15-16　双光子单光子聚焦对比

由此可知，在单光子吸收过程中，当激光束聚焦在样品中的一点时，由于单光子的吸收几率较大，会在样品的整个受光部分产生荧光。而在多光子吸收情况下，发射荧光只能在激光束的焦点或附近产生。所以相对来讲，双光子的精度更高，而且，由于避免了非聚焦点荧光的干扰，因此不需要 pinhole 滤光。检测器可以直接精确地检测到定点部位的信号，从而大大提高成像亮度和信噪比。

四、双光子共聚焦显微镜的优点

(1) 避免了使用紫外光以及复杂的紫外波段物镜和紫外光学元件。

(2) 具有较深的传播距离，可对浑浊样品表面以下较深处(>200μm)成像。

(3) 飞秒量级的锁模钛宝石激光器可以比较容易产生足够强的激光。

在实际应用中，单光子和双光子共聚焦系统拥有各自的优缺点。应该根据实验的需要来选择合适的实验方法和仪器。

第九节　注意事项及维护保养

(1) 仪器环境周围要远离电磁辐射源。

(2) 环境无震动，无强烈的空气扰动。

(3) 室内具有遮光系统，保证荧光样品不会被外源光漂白。

(4) 环境清洁干净。

(5) 工作温度在5℃～45℃。

激光扫描共聚焦显微镜安装在万级无菌室中，可保证温度、湿度恒定，环境洁净，并且配以超稳防震台以避免微小震动对实验结果造成影响。

第十六章　活细胞显微成像技术

活细胞显微成像技术是研究细胞运动、分裂和命运的必要手段。在细胞整体水平，对细胞的运动状态和轨迹进行长时间追踪，对细胞的命运直接观测，对细胞的分裂过程及结果进行跟踪记录；在亚细胞水平，能够观察细胞器如线粒体、内质网、高尔基体和染色体等在细胞周期及细胞执行生理功能中的动态变化；在分子水平，能够直接观察单个蛋白质分子在细胞内的动态定位和代谢过程（TIRF 单分子荧光检测），追踪细胞内蛋白质的合成、转运和降解（FRAP 荧光淬灭恢复检测），测定蛋白质—蛋白质间的相互作用（FRET 荧光共振能量转移）。它是细胞生物学、分子生物学、遗传学、免疫学、神经生物学和生理学等学科中十分重要的实验技术之一。

第一节　活细胞荧光工作站

活细胞光学显微成像技术中的主要仪器是活细胞荧光工作站。它由以下几个部分组成：荧光激发和显微成像系统、图像信号采集系统、环境控制系统、光损伤控制系统、计算机控制和信号处理系统，还包括显微操作系统等附属部分，如图 16-1 所示。

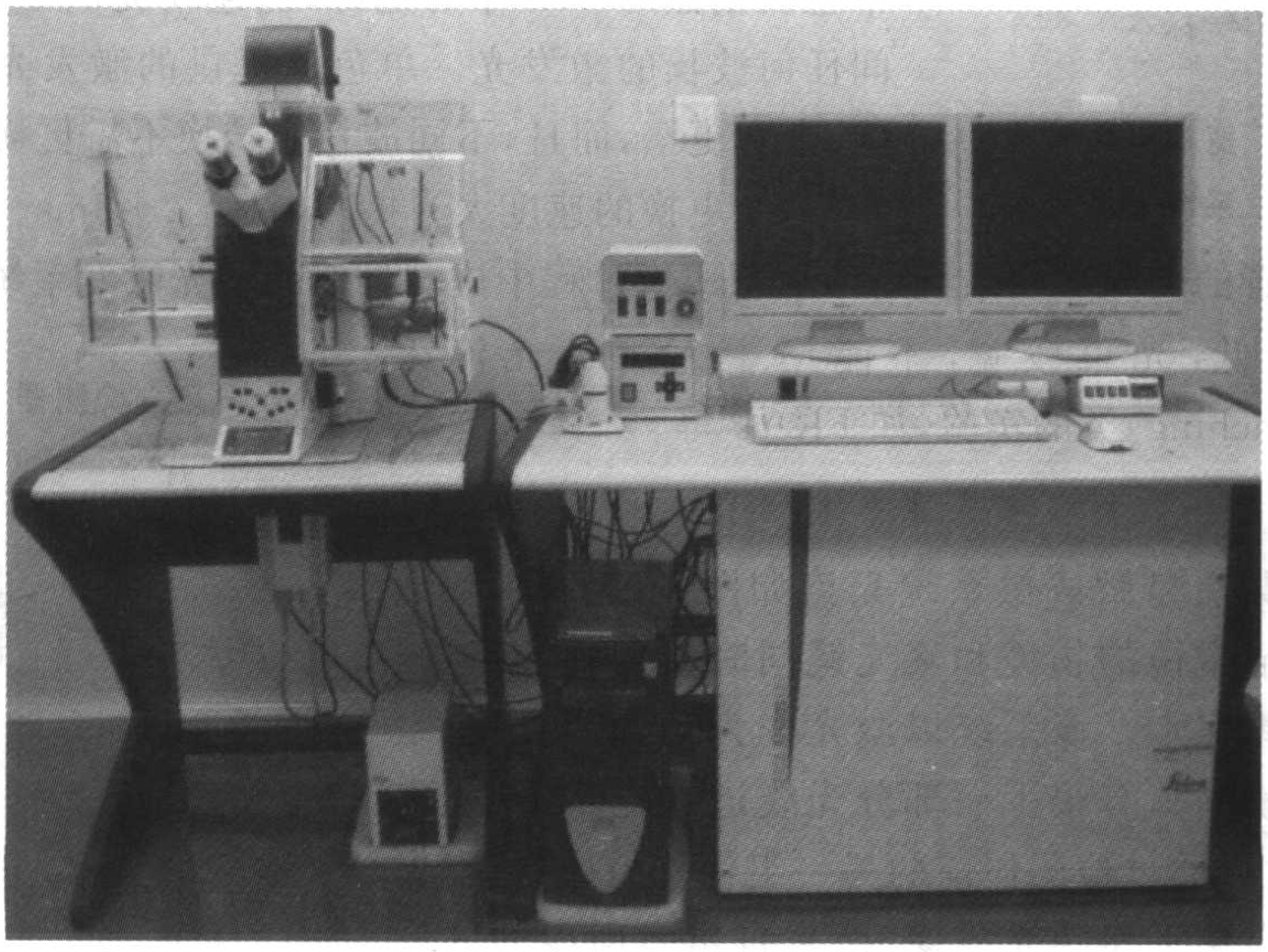


图 16-1　活细胞工作站

一、荧光激发和显微成像系统

活细胞工作站的荧光激发和显微成像系统一般是建立在一台研究级的倒置显微镜上。根据荧光激发方式和显微成像原理的不同，活细胞显微成像系统可分为三类。最常用的是传统荧光显微镜所用的荧光激发和成像方式，该方式中的显微镜物镜能收集标本全景深所发出的荧光，所以又称为宽视野显微成像系统（widefield microscopes）。另外两种都是激光共聚焦显微镜的荧光激发成像方式，分别为扫描共聚焦显微成像系统（scanning confocal microscopes）和转盘共聚焦显微成像系统（spinning disk confocal microscopes）。

（一）宽视野显微成像系统

宽视野显微成像系统光路如图16-2所示。光源发射全波段光线，经过棱镜的反射和过滤，照射到标本上，激发荧光蛋白发出相应荧光，再由CCD收集荧光信号。常用的光源是汞灯或氙灯。汞灯发射的是全波段的光。为满足不同荧光蛋白需要的不同波长激发光，工作站系统应根据需要配备相应的荧光激发棱镜和荧光滤片。当标本中的荧光蛋白需要不同波长的激发光时，一般通过改变激发棱镜和滤色片来实现，这时需要考虑棱镜和滤色片的更换速度。滤色片转轮和单色仪的使用，大大提高了波长转换的速度。单色仪用氙灯（Xe）作为光源，能连续提供300～700nm间任何波长的激发光。单色仪提供的激发光波长更精确、带宽更窄，而且，不同波长的转换不需更换任何光学元件，使更换的速度大为提高，只需2～3ms。

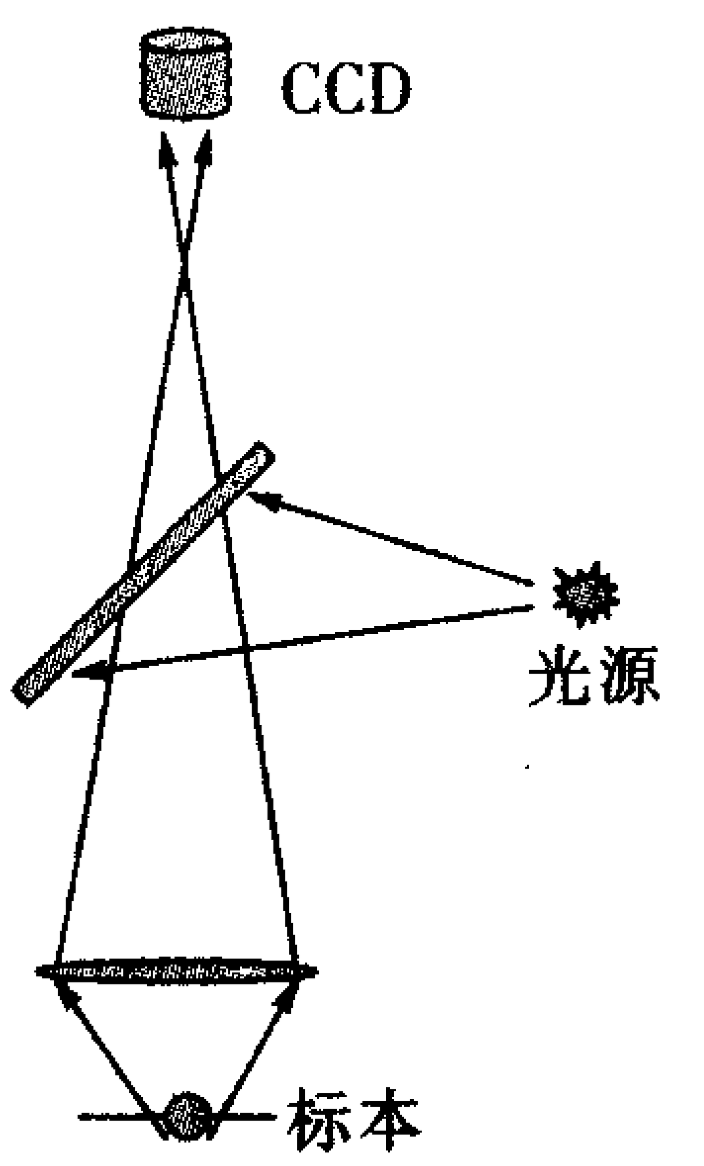


图16-2 宽视野显微成像系统光路示意图

宽视野的荧光激发系统是活细胞成像过程中成本最低的荧光激发系统。由于光束能量较低，光束较宽，不能用于人工荧光淬灭（photobleaching）类的实验，如FRAP等。

（二）扫描共焦显微成像系统

扫描共焦显微成像系统光路如图16-3所示。激光共聚焦显微镜的物镜和聚光镜同时聚焦到一点，因此称为共聚焦点。该系统以激光作为光源，利用一组针孔使一瞬间只有很少一部分光线进入光路，激发出荧光，荧光再通过检测器前的另一组针孔后成像，以保证只有来自焦平面的光成像，而来自焦平面以外的散射光都被针孔挡住，从而得到清晰的图像。由于能够通过计算机程序控制来自动改变观察的焦平面，因此

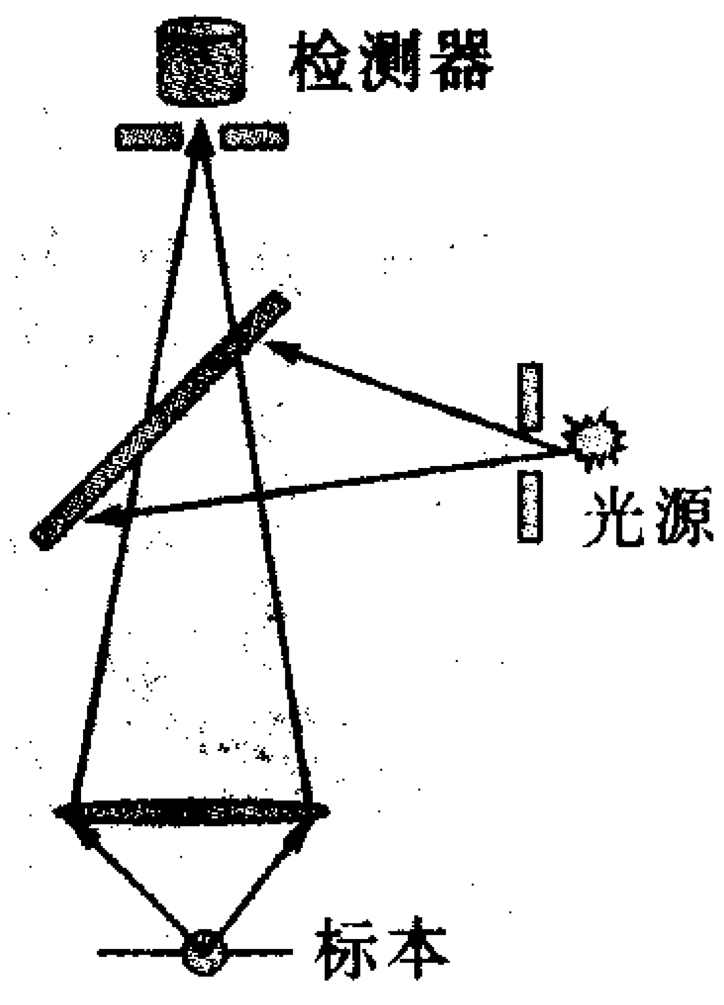


图16-3 扫描共焦显微成像系统光路示意图

可以借助“光学切片”来观察样品内部结构，将通过改变焦点获得的一系列样品不同光切面上的图像，经过叠加后便可重构出样品的三维结构。扫描共焦显微成像系统目前已经成为活细胞成像技术中常用的设备。由于共焦系统可以将激发光的照明点限制在很小的区域，因此，诸如 FRAP(fluorescence recovery after photobleaching)和 FLIP(fluorescence lost in photobleaching)等荧光漂白实验可以通过这个平台轻松实现。当然，扫描共焦显微成像系统也存在一些缺陷，如采用激光作为激发光源，激发光的波长则受限于所用的激光等。另外，激发光束转换慢，限制图像获取的速率。该系统组成复杂，设备成本和使用成本较高。

（三）转盘共焦显微成像系统

转盘共焦显微成像系统光路如图 16-4 所示。转盘共聚焦显微成像系统是另一种共聚焦形式，也是用激光作为光源。但与扫描共焦系统不同的是，该系统配备两个高速旋转的转盘(spinning disk)，在两个转盘上对应有很多组针孔。当两个转盘同时高速旋转时，相当于有无数束光线依次通过不同位置的针孔照射到标本上进行成像。据此，该系统大大提高了对同一焦平面的扫描速度，减少了标本被照射的时间，降低了激光对标本的损坏。因此，转盘共焦显微成像系统更适用于活细胞成像。但是，该系统也存在一些不足。首先，激光光源限制了激发光的波长选择；其次，进行单色荧光成像的速度虽快，但当进行多色荧光成像时，更换光束较慢，限制了总体的成像速度；第三，不能进行荧光漂白类的实验。

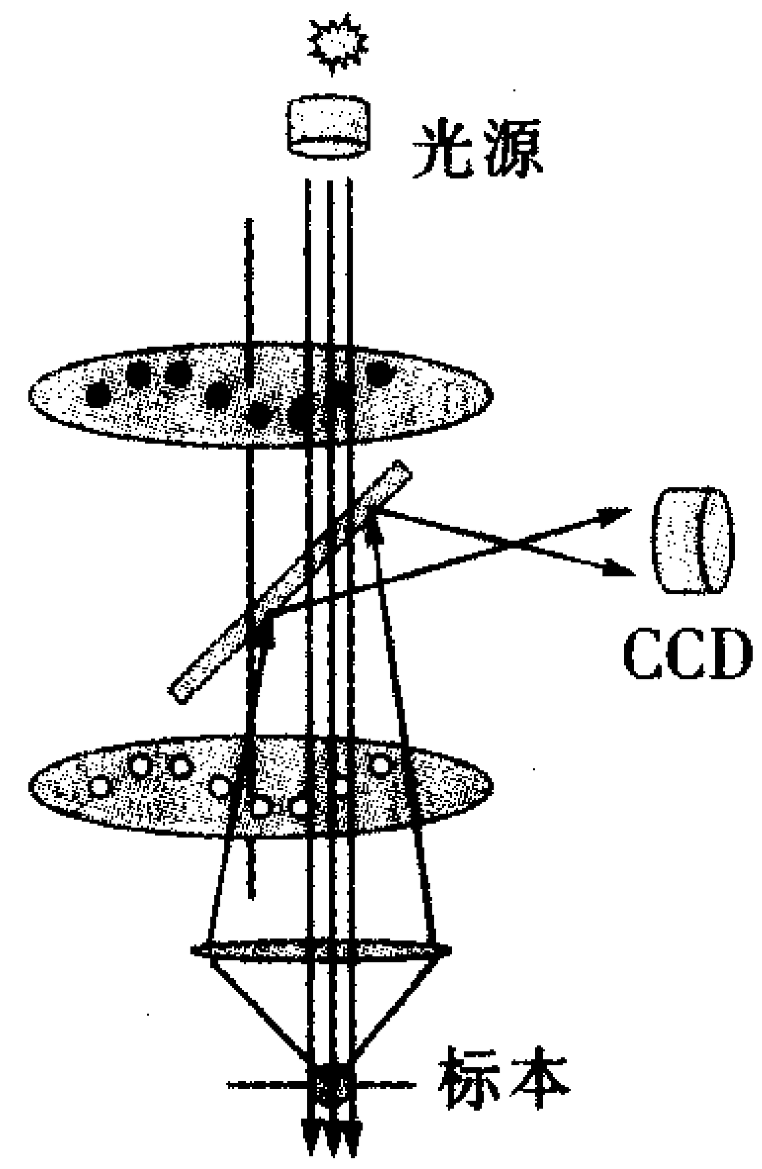


图 16-4　转盘共焦显微成像系统光路示意图

总之，三种显微成像系统都有明显的优势和不足，因此，在活细胞显微成像实验中，应根据实际需要来选择合适的系统。

活细胞显微成像系统的主体是倒置荧光显微镜，为满足活细胞实时摄影的需要，该倒置荧光显微镜应具有以下配置：

1. 全自动数控载物台

活细胞显微成像系统中的显微镜载物台必须是全自动控制的。因为在进行活细胞实时摄影时需要对培养皿中不同区域的细胞轮流进行定期地拍摄，并且所有区域所拍摄的照片最终要通过计算机处理拼接成一张完整照片，或将每一区域不同时间的照片做成电影。这就要求视野的更换、回复原位等要达到高速度、高精确度。显然，手工移动载物台已经不可能满足这些要求，因此，载物台的水平运动必须通过计算机的程序控制来完成。另外，载物台上要配备各类卡具（如图 16-5 所示），以便于安放各类用于培养细胞的平皿。同时，载物台上必须能够安放微型细胞培养箱。

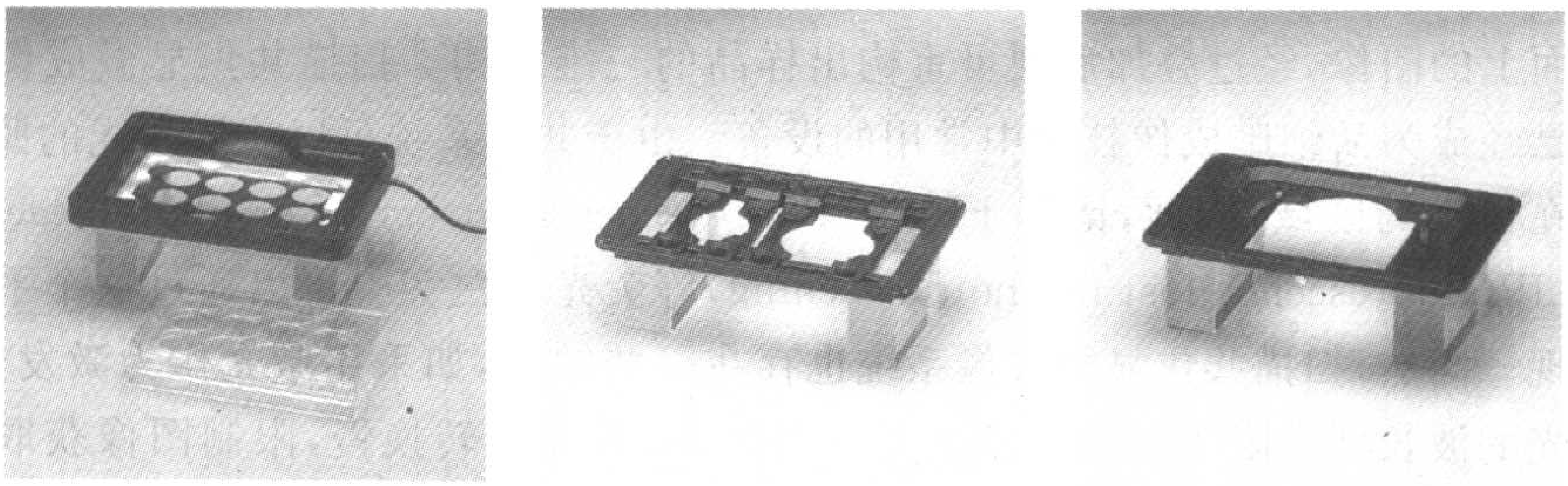


图 16-5　适合各类平皿的卡具

2. 全自动物镜转换器

活细胞显微成像系统的物镜转换器和载物台一样，也要求全自动，由计算机控制物镜的转换和自动聚焦。在长时间实时摄影过程中，载物台的频繁移动、载物台及其承载的细胞培养设备等的自身重量和各种器件的热胀冷缩必然会导致聚焦平面的漂移，从而影响图像的清晰度。而物镜转换器的定时自动聚焦则能够保证长时间实时摄影过程中焦平面的稳定和图像的清晰。

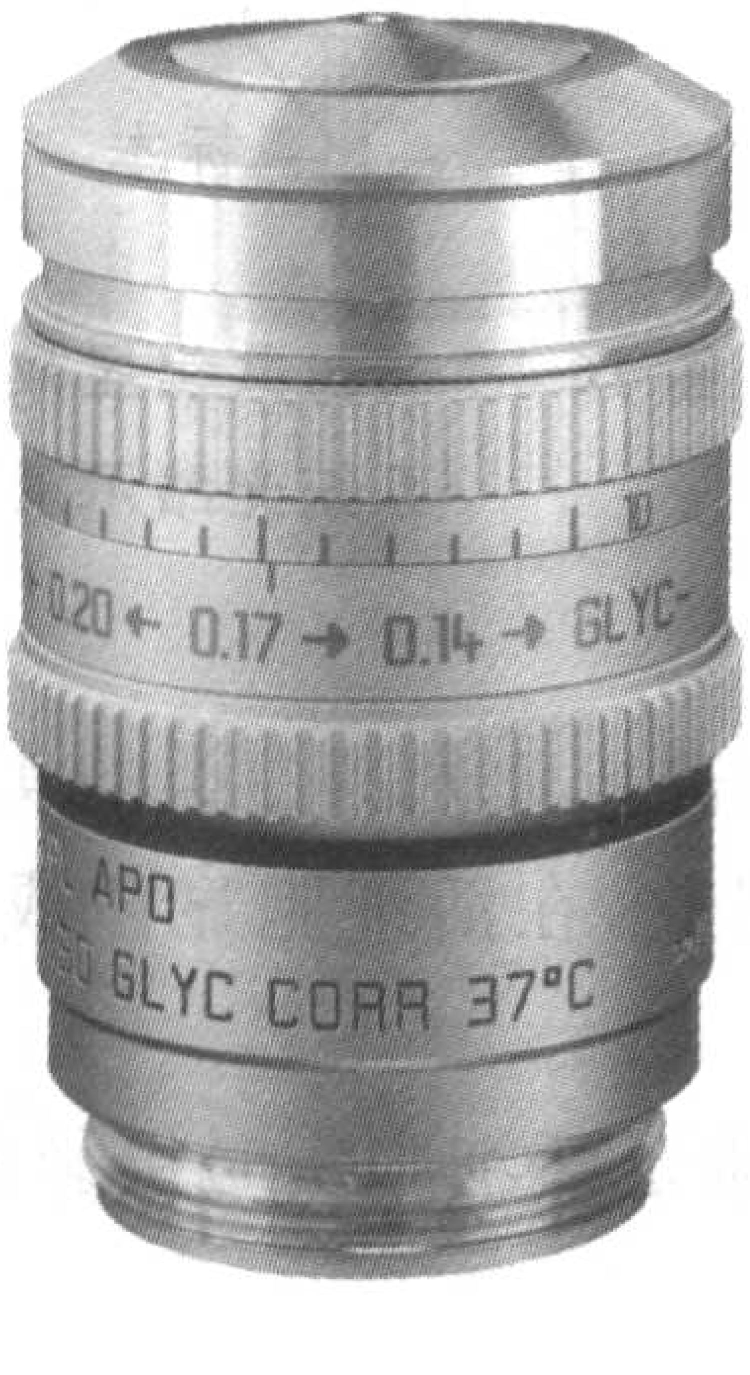


图 16-6　37℃专用物镜

3. 物镜

活细胞显微成像系统所用的物镜和普通荧光显微镜的物镜也有区别。首先，该系统选用的物镜需要更高的数值孔径。因为较大的数值孔径有利于光线的采集，可提高成像质量和速度。一般不选用长工作距离的物镜，因为工作距离加长会导致数值孔径缩小，从而影响成像效果。其次，该系统中使用的物镜必须适合长时间工作在 37℃左右、湿度在 90%以上、二氧化碳浓度在 5%左右的细胞生长环境中。另外，高倍物镜需要是浸油（甘油）系物镜。37℃专用物镜如图 16-6 所示。

4. Z 轴光切器

该光切器是进行数码共聚焦的必备设备。Z 轴光切器通过计算机的控制能够在一定的范围内上下移动物镜，使成像的焦平面也随之移动，形成多层光切图像，如图 16-7 所示。将所有通过移动焦平面获得的图像进行分析运算，就可以获得标本的三维结构重建图像。现在常见的 Z 轴光切器移动范围大约为 100μm，步进精度约 20nm。Z 轴光切器的使用替代了成像扫描时物镜转换器的上下移动，这样大大提高了扫描的速度和精度，并保证了成像系统的稳定性。

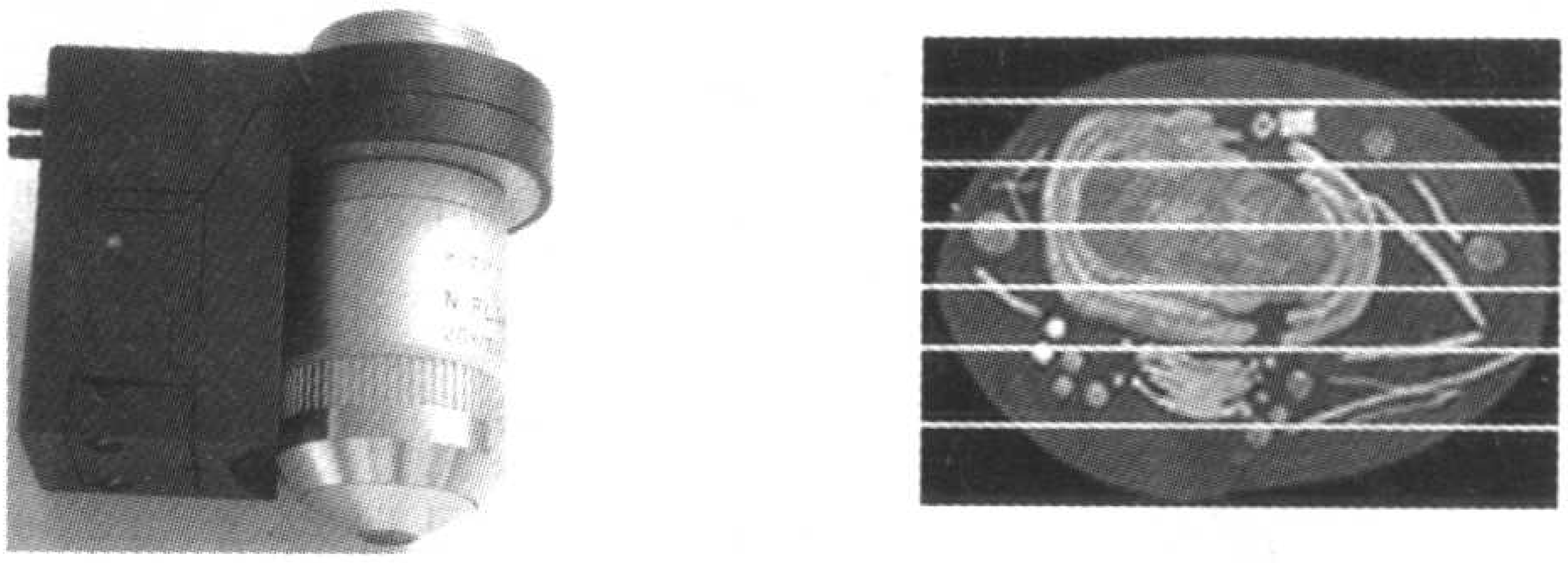


图 16-7　Z 轴光切器及光切示意图

5. 荧光管理器

活细胞显微成像系统配备的荧光管理器同样是全自动设备，可以由计算机控制荧光模块以及滤色片的自动转换。由于激发光对活细胞具有伤害作用，荧光管理器必须能对光强进行调节，并尽量减少激发光对细胞的照射。为解决这一问题，圆形转盘再次被采用，不同孔径的光阑和不同的滤色片被安装在转盘上，通过转盘的旋转达到不同光强的切换和不同波长激发光的切换，从而提高切换的速度，降低光损伤。

二、图像信号采集系统

图像采集设备的性能对于整套活细胞工作站至关重要，因为图像采集设备的灵敏度越高，对系统的照明光强度要求也就越低，对细胞的光损伤也越小。高灵敏度 CCD（Charge-Coupled Device）（如图 16-8 所示）已被广泛应用于活细胞工作站的图像采集，新近开发的一种新型照相机能够放大从 CCD 芯片中读出的信号，使图像采集能力得到进一步提高。另外，从多像素点中组合信号也能提高照相机的灵敏度，但该方法会降低图像的分辨率。在扫描共聚焦系统中图像信号采集使用的光电倍增管，相对而言它的灵敏度要比 CCD 差一些。



图 16-8　高灵敏度照相机

三、环境控制系统

活细胞荧光工作站的最大优势是追踪探测细胞的生长、繁殖、命运、代谢及其分子机制，这就要求所研究的细胞必须处于最佳的生理状态，因此在活细胞工作站上装配环境控制系统显得尤为重要。

细胞培养需要合适而且稳定的环境，如温度、湿度和二氧化碳浓度。为了满足培养细胞对环境的要求，活细胞工作站安装了两个用有机材料制成的有机玻璃室。其

中大的有机玻璃室将载物台、物镜、集光器等包含在内，室内的温度通过温度控制系统进行调节。在大的有机玻璃室内载物台上安装了一个小的有机玻璃室即微型培养室，微型培养室内的空气湿度和二氧化碳浓度可通过加湿装置和二氧化碳控制系统进行调节。为了满足对细胞进行长时间观察等的需要，还可在微型培养室内加装灌流设备（如图16-9所示），以更换培养液或补充新鲜培养液，减少代谢废物，保证细胞的正常生长。

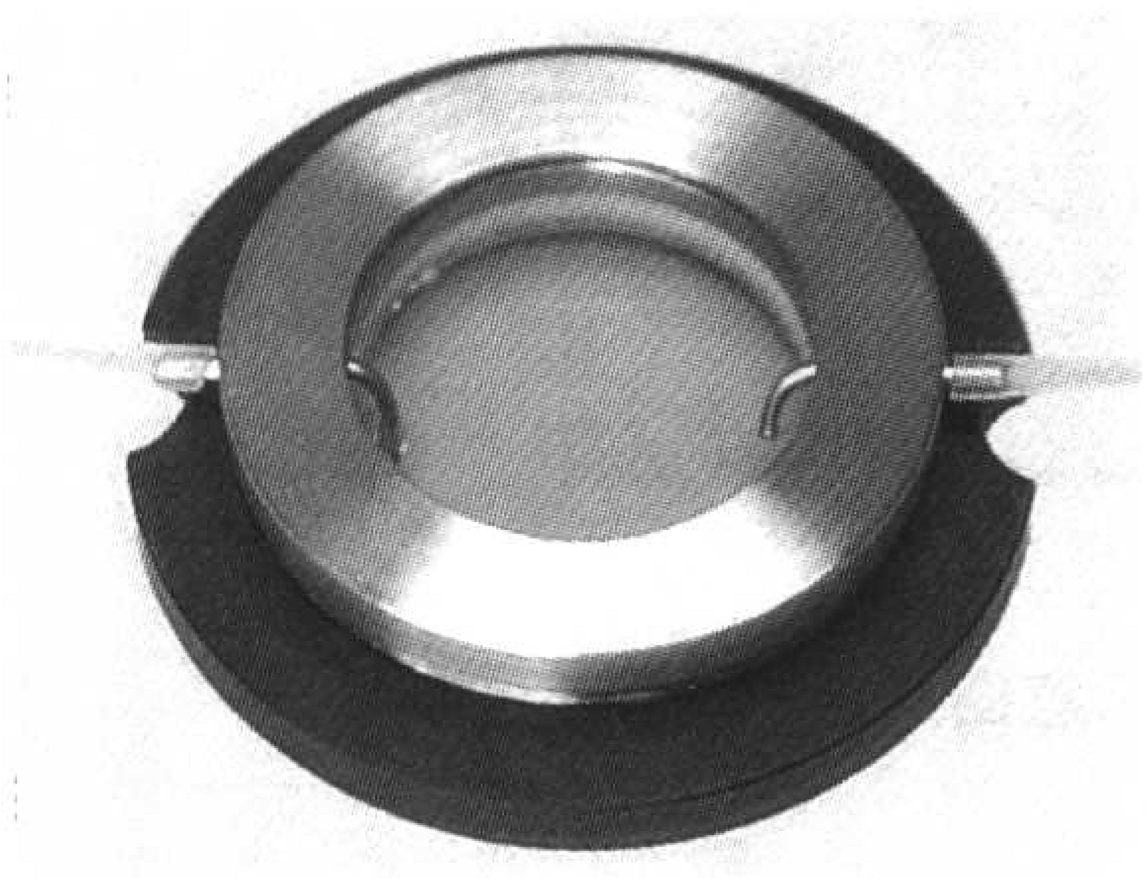


图 16-9 灌流装置

四、光损伤控制系统

细胞对光线都非常敏感，尤其是含有荧光基团的细胞，因为光线尤其是波长较短的光照射细胞时会产生很多自由基，导致细胞内遗传物质的损伤。要减少光损伤，就要减少光对细胞照射的时间和光强度。这就要求在不进行图像采集时迅速停止光线对细胞的照射。在光路中安装电动快门可解决这一问题，电动快门的开关通过计算机控制，在需要采集图像时打开然后闭合，电动快门的速度可以达到数十毫秒。另外，降低氧的含量也可以减少自由基的产生。如将细胞培养在密闭的容器中则可减少细胞生存微环境中的氧含量。

五、计算机控制和信号处理系统

活细胞荧光工作站的计算机控制主要是通过软件对工作站中的各个电动部件进行自动调控，同步记录实验数据。具体来说，是通过计算机软件控制电动载物台的水平和垂直方向的移动，设定显微镜自动聚焦和Z轴扫描的各种参数，设定对标本进行定时和定位扫描的参数，实现对棱镜和滤片的自动转换，控制荧光高速快门以及照相机快门的自动开合。尤其是在进行长时间活细胞实时摄影过程中，所有的电动设备都要通过软件的设定高速协调有序地自动运行，任何一个设备的运行出错都会造成实验失败。

信号处理系统则借助计算机对图像信号进行采集以及采集后的管理、运算、重建和输出等。包括图像增强处理、图像测量、视野标记和复位、细胞追踪、宏观拼图、Deconvolution 去模糊、三维重建、荧光共定位（Co-localization）分析、光谱分析、荧光共振能量转移（FRET）、离子测量、活细胞电影制作等。

第二节　其他活细胞显微成像技术

一、全内反射显微镜技术

全内反射荧光显微镜技术(total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM)是近年来新兴的一种光学成像技术，它利用全内反射产生的隐失场来照明样品，使得在百纳米级厚度的标本内部的荧光基团受到激发，荧光成像的信噪比大大提高。

全内反射现象，如图 16-10 所示，当一束平面光波从一种介质进入到另一种介质中时，入射光在两种介质接触面处一部分发生反射，一部分发生折射；当入射角增大时，透射角也增大。当光线以大于或者等于临界角入射时，入射光在界面处只发生反射而不再折射，也就是发生了全反射。在用显微镜观察活细胞时，如发生全反射，光线会在玻璃界面上被完全反射而不进入液体中。实际上，由于波动效应，有一部分光的能量会穿过界面渗透到溶液中，平行于界面传播。这部分光就是所谓的隐失波。隐失波是一种非均匀波，它沿着入射面上的介质边界传播，在平行界面方向以平行波场方式传播而在垂直界面方向则是呈指数衰减。对于可见光波而言，浸透深度约为 100nm。

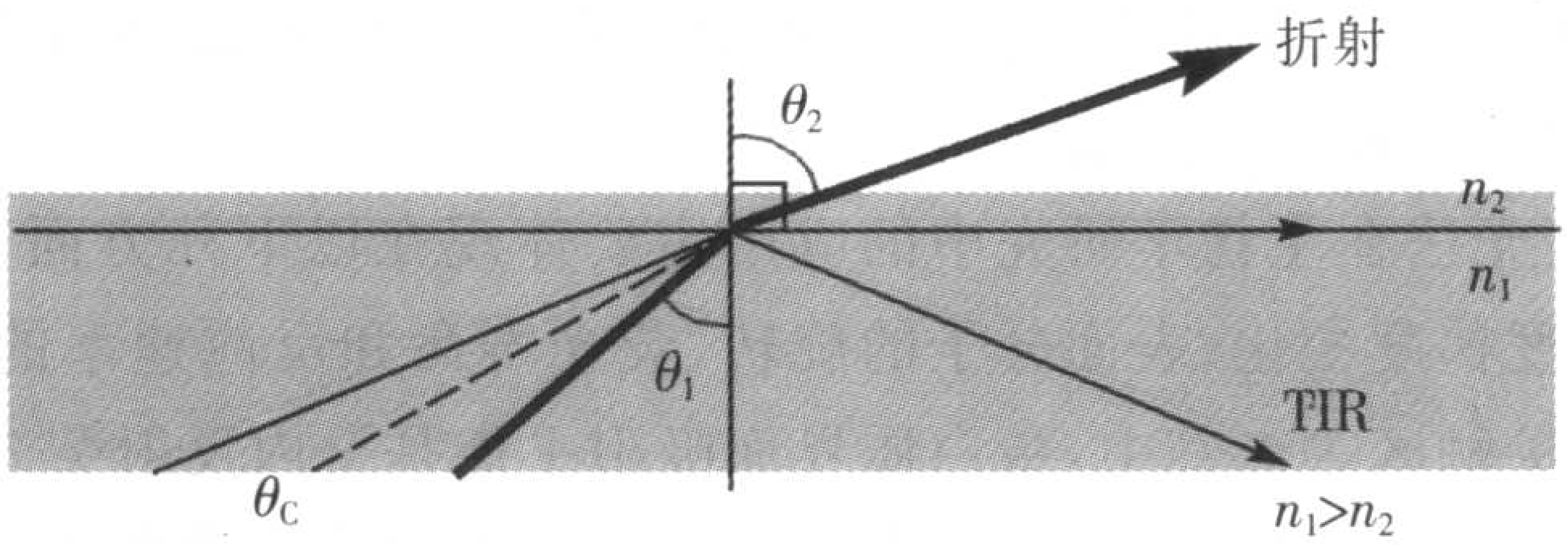


图 16-10　全内反射光路示意图

细胞的很多至关重要的生命活动发生于细胞表面，如果我们可以直接对细胞表面的这些过程进行观测，并排除来自细胞内深层区域信号的干扰，这对细胞生物学研究来说是一项重大突破。全内反射荧光显微镜的最大优势就是利用隐失波照明，荧光激发的深度只在约 100nm 的薄层范围内，从而成为细胞表面研究如配体—受体反应中生物化学动力学、单分子动力学的最有前途的光学成像技术。

科学家们已经研制出多种全内反射荧光显微成像系统。其中最为普遍的是棱镜型和物镜型，如图 16-11 所示。棱镜型成像系统的隐失场是入射光经棱镜发生全反射产生的，而物镜型的是入射光经物镜全反射产生。隐失波激发生物样品的荧光分子，荧光分子发出的荧光经过物镜成像到照相机或 CCD 上，从而实现对生物样品的

记录。这两种形式的显微镜各有优缺点，对于棱镜型而言，实现起来相对简单，其缺点也很明显。由于要达到较高的光学分辨率，要求接收荧光的物镜有较短的工作距离，这样留给生物样品和物镜之间的空间较小，所以在此系统上安装一些诸如原子力显微镜、近场光学显微镜等其他探测仪器非常困难。

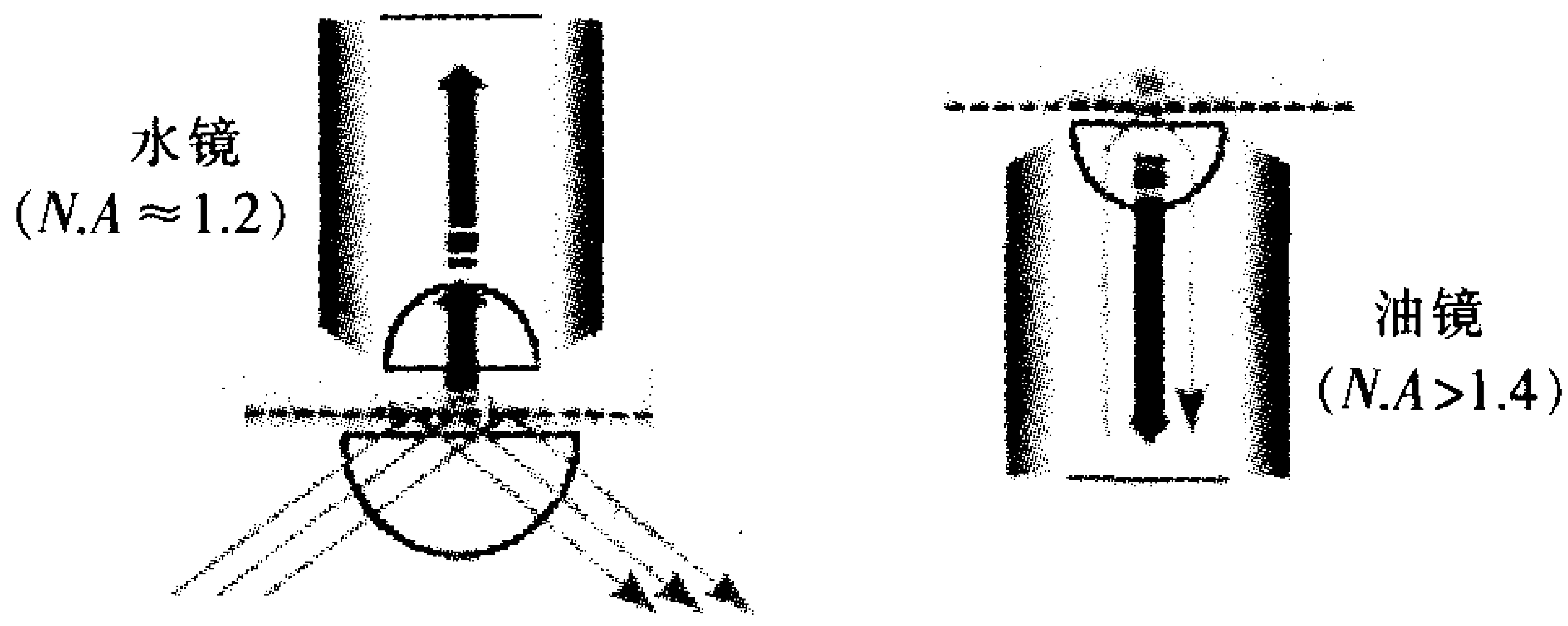


图 16-11 棱镜型和物镜型全内反射荧光显微成像系统光路示意图

由于荧光的接收必须经过被观察样品的上部，这样荧光必然会有散射、衰减及其他光信号的干扰，使观察的效果有所下降。物镜型系统则可以克服上述缺点。物镜型显微镜的物镜既作为收集样品荧光信号的接受器，同时又作为发生全反射的光学器件。激光聚焦到物镜后焦面并经过物镜边缘入射，物镜出射光为平行光并斜入射至盖玻片上，调节激光入射位置和角度，即可达到全内反射要求，从而实现隐失波照明。隐失波所激发的荧光仍旧经过物镜接收，通过双色镜滤掉除荧光以外的其他波长的光，成像在物镜后方的照相机或 CCD 上，实现对生物样品的荧光记录。由于样品上方空间完全空出，并且所接受的荧光没有被样品干扰，所以目前大多数生物学家采用物镜型全内反射荧光显微镜。

全内反射荧光法在生物学研究中的应用主要体现在以下几方面：蛋白质吸附平衡、表面分子浓度梯度变化、表面分子的旋转、荧光寿命和反应速率的测量及选择性观测细胞、底物接触区等。其中，蛋白质界面吸附平衡是全内反射荧光法的重点应用领域，可通过研究蛋白质在人工表面的吸附平衡来了解各种生物材料的表面性质。利用一种 pH 敏感荧光基团产生的全内反射荧光，可观测吸附水解酶的自发重构化。全内反射荧光技术还广泛应用于实时监测核酸相互作用，考察吸附在石英上的水解酶分子的重定向机制，观察细胞膜在 100nm 范围内的实时活动过程。

全内反射荧光显微术作为细胞表面单分子成像的一种新兴技术，一方面可与其他显微成像技术如荧光光谱技术（FCS）、荧光寿命成像技术（FLIM）以及原子力显微术（AFM）综合运用；另一方面其本身也不断发展，衍生出双色和多色 TIRFM，随着光电探测设备探测效率和探测速度的提高以及单分子染色技术的发展，我们有理由相信，全内反射荧光显微术将会在活细胞光学显微成像中发挥更大作用。

二、荧光相关光谱技术

荧光相关光谱(Fluorescence Correlation Spectroscopy,FCS)是一种统计小样本中荧光分子的荧光强度波动的分析方法。在这种方法的经典模式中,样本体积被聚焦激光束和共焦小孔所限定,样本发出的荧光被高数值孔径的显微镜物镜所收集,然后被灵敏的单光子计数器所监测。被探测到的荧光是随时间波动的,且这些时间函数是自相关的。归一化的荧光波动自相关函数提供了两类信息,函数的大小反比于所观测的荧光分子的平均数量,时间衰退的速率和形态反映了所观测的荧光分子的动力学特征。

最近,由于探测手段、自相关电子学等方面的技术进步以及共聚焦显微镜被整合到 FCS 中,FCS 在生物化学中的研究和应用越来越广泛。除了传统的分子浓度和扩散时间的测量,当它们引起的荧光波动在时间上快于扩散时间时,FCS 还可测量分子动力学或化学反应的动力参数,这包括单分子反应、跨系统转运、三态动力学、光转换和可逆的光漂白。

在自然生理环境下进行活细胞研究是一种挑战,但 FCS 能解决这一问题,它既考虑了灵敏性,又考虑了空间和时间分辨率。然而对 FCS 的一些基础实验理论仍需要进行更深入地研究,还有许多问题和困难需要解决。令人欣慰的是,FCS 可以被用来测量活细胞内单个荧光分子的胞内浓度、扩散和动力学参数,提供了一种能定量分析分子相互作用网络的有效方法。

作为一种可以广泛应用于生物学研究之中、可分析多种生理现象的监测方法,近年来 FCS 已经获得了较大发展。由于包括双光子激发、PCH(光子计数方图)分析、互相关、影像相关、衰减光照射等方法出现和技术上的改进,使得 FCS 可被应用于许多方面。FCS 现已被有效地应用于多种生物系统,如配体与受体相互作用、与疾病有关的蛋白质聚合、DNA 和蛋白质相互作用、蛋白质与蛋白质相互作用、膜域和细胞表面受体聚类等。目前已有大量针对 GFP 和其他一些可能会适于活体研究的探针的激发态动力学研究在进行,这方面的一些最新研究成果表明,FCS 将是一种可以广泛应用的方法,不仅可以在溶液中描述过程特征,也可以在全能细胞和它们的膜中分析一些生理生化过程特征。

三、荧光共振能量转移技术

随着生命科学研究地不断深入,对各种生命现象发生的机制,特别是对细胞内蛋白质—蛋白质间相互作用的研究变得尤为重要。要在这方面的研究中取得重大突破,技术进步是必不可少的。近年来,一些传统的研究方法如酵母双杂交、免疫共沉淀、荧光免疫染色等虽得到长足发展,但这些方法都需要破碎细胞或固定细胞,无法

观察到生理条件下活细胞内蛋白质—蛋白质间相互作用的动态变化。应用荧光共振能量转移技术(fluorescence resonance energy transfer,FRET)并结合基因工程等技术则可弥补这一不足。

荧光共振能量转移是指两个荧光发色基团在足够靠近时,供体分子吸收一定频率的光子后被激发到更高的电子能态,在该电子回到基态前,通过偶极子相互作用,实现了能量向邻近的受体分子转移(即发生能量共振转移)。下面以 GFP 的两个突变体 CFP 和 YFP 为例简要说明其原理:CFP 的发射光谱与 YFP 的吸收光谱有相当的重叠,当它们足够接近时,如用 CFP 的激发光照射标本,被激发的 CFP 的发色基团就会把能量高效率地转移至 YFP 的发色基团上,发出 YFP 的荧光,这样 CFP 发射的荧光将减弱或消失,而 YFP 发射的荧光将大大加强。两个发色基团之间的能量转换效率与它们之间的距离的 6 次方成反比,即对空间位置的改变非常灵敏。因此,如要研究两种蛋白质 a 和 b 在活细胞内的直接相互作用,可以通过转基因技术获得融合蛋白,使融合蛋白 a 与 CFP 耦联,蛋白质 b 与 YFP 耦联。用 CFP 吸收波长 433nm 作为激发光波长,如果蛋白质 a 与 b 不发生直接的相互作用,CFP 与 YFP 就因相距较远而不能发生荧光共振能量转移,因而检测到的是发射波长为 476nm 的 CFP 荧光;但当蛋白质 a 与 b 发生直接的相互作用时,蛋白质 a 与 b 非常接近,使 CFP 与 YFP 也充分靠近,从而发生荧光共振能量转移,使检测到的是发射波长为 527nm 的 YFP 荧光。因此,利用 FRET 技术并结合转基因操作,可以研究生理条件下细胞中蛋白质—蛋白质的直接相互作用。

FRET 技术已被广泛应用于活细胞内各类蛋白之间的相互作用,包括检测蛋白激酶活性以及细胞凋亡过程中各种酶的调控和活性变化等。另外,在膜生物学的研究中,FRET 技术被用于受体激活效应在细胞膜上的横向扩散、膜蛋白的定位修饰、细胞膜受体之间相互作用的观察。

第十七章 活体体内荧光成像技术

活体体内荧光成像(optical in vivo imaging)技术是利用一套非常灵敏的光学检测仪器，直接监控活体体内带有荧光标记的细胞活动和基因行为。通过这个系统，可以观测活体动物体内肿瘤的生长及转移、感染性疾病发展过程、特定基因的表达生物学过程。传统的动物实验方法需要在不同的时间点宰杀实验动物以获得数据，得到多个时间点的实验结果。相比之下，活体体内荧光成像通过对同一组实验对象在不同时间点进行记录，跟踪同一观察目标(标记细胞及基因)的移动及变化，所得的数据更加真实可信。这一技术对肿瘤微小转移灶的检测灵敏度极高，不涉及放射性物质和方法，非常安全。因其操作极其简单，所得结果直观，灵敏度高等特点，在刚刚发展起来的近几年时间内，已广泛应用于生命科学、医学研究及药物开发等方面。

活体体内荧光成像技术是在 1995 年出现的，但大量的研究工作是在最近两年才进行的。目前国内已有数家单位购买了该系统进行相关的研究，许多研究者对这项技术产生了浓厚的兴趣，越来越多的人开始计划用该技术进行肿瘤学、流行病学、药物学等方面的研究。

活体体内荧光成像技术观察的范围是大体标本的范围，不能对细胞内精细结构进行观察。所以它只适合作肿瘤转移研究、基因治疗、流行病学的发病学研究，干细胞示踪、白血病的相关研究，以及通过一系列转基因疾病动物模型来快速直观地进行相关疾病的发病机理和药物筛选的研究。

一、基本原理

(一) 活体体内发光原理

活体体内发光采用生物发光(bioluminescence)与荧光(fluorescence)两种技术。生物发光是用荧光素酶(luciferase)基因标记细胞或 DNA，而荧光技术则采用荧光报告基团(GFP、RFP，Cyt 及 dyes 等)进行标记。

通常是将 Fluc 基因整合到细胞染色体 DNA 上以表达荧光素酶，当外源(腹腔或静脉注射)给予其底物荧光素(luciferin)，即可在几分钟内产生发光现象。这种酶在 ATP 及氧气的存在条件下，催化荧光素的氧化反应才可以发光，因此只有在活细胞内才会产生发光现象，并且光的强度与标记细胞的数目线性相关。对于细菌，Lux 操纵子由编码荧光素酶的基因和编码荧光素酶底物合成酶的基因组成，带有这种操纵子的细菌会持续发光，不需要外源性底物。

基因、细胞和活体动物都可被荧光素酶基因标记。标记细胞的方法基本上是通过分子生物学克隆技术，将荧光素酶的基因插到预期观察的细胞的染色体内，通过单克隆细胞技术的筛选，培养出能稳定表达荧光素酶的细胞株。目前，常用的细胞株基本上都已标记好，市场上已有销售。将标记好的细胞注入小鼠体内后，观测前需要注射荧光素酶的底物——荧光素，约 280Da 的小分子。荧光素脂溶性非常好，很容易透过血脑屏障。注射一次荧光素能保持小鼠体内荧光素酶标记的细胞发光 30～45min。每次荧光素酶催化反应只产生一个光子，这是肉眼无法观察到的，应用一个高度灵敏的制冷 CCD 相机及特别设计的成像暗箱和成像软件，可观测并记录到这些光子。

（二）体内透过光线的原理

光在哺乳动物组织体内传播时会被散射和吸收，光子遇到细胞膜和细胞质时会发生折射现象，而且不同类型的细胞组织吸收光子的特性并不一样。血红蛋白(hemoglobin)是造成体内可见光被吸收的主要因素，其吸收可见光蓝绿波段的大部分。但是在可见光大于 600nm 的红光波段，血红蛋白的吸收作用却很小。因此，在偏红光区域，大量的光可以穿过组织和皮肤而被检测到。用精诺真公司的 IVIS 系统最少可以看到距皮下 500 个细胞处，由于发光源在老鼠体内深度不同，可看到的最少细胞数目是不同的。在相同的深度情况下，检测到的发光强度和细胞的数量具有非常好的线性关系。可见光体内成像技术基本原理在于光可以穿透实验动物的组织并且可由仪器量化检测到的光强度，同时反映出细胞的数量。

二、基本组成

活体荧光成像系统采用数字化超高灵敏度的 CCD，与灵活多变的激发光源可直接采集荧光染料标件进行定量分析，得到实时监测结果。利用光学成像对荧光表达产物的分布进行定位，能够在活体中特异、灵敏、便捷地实施成像过程，通过载物台上方的滤光片可以直接用肉眼观察到小鼠身上发荧光的部位。

该系统主要由三部分组成。

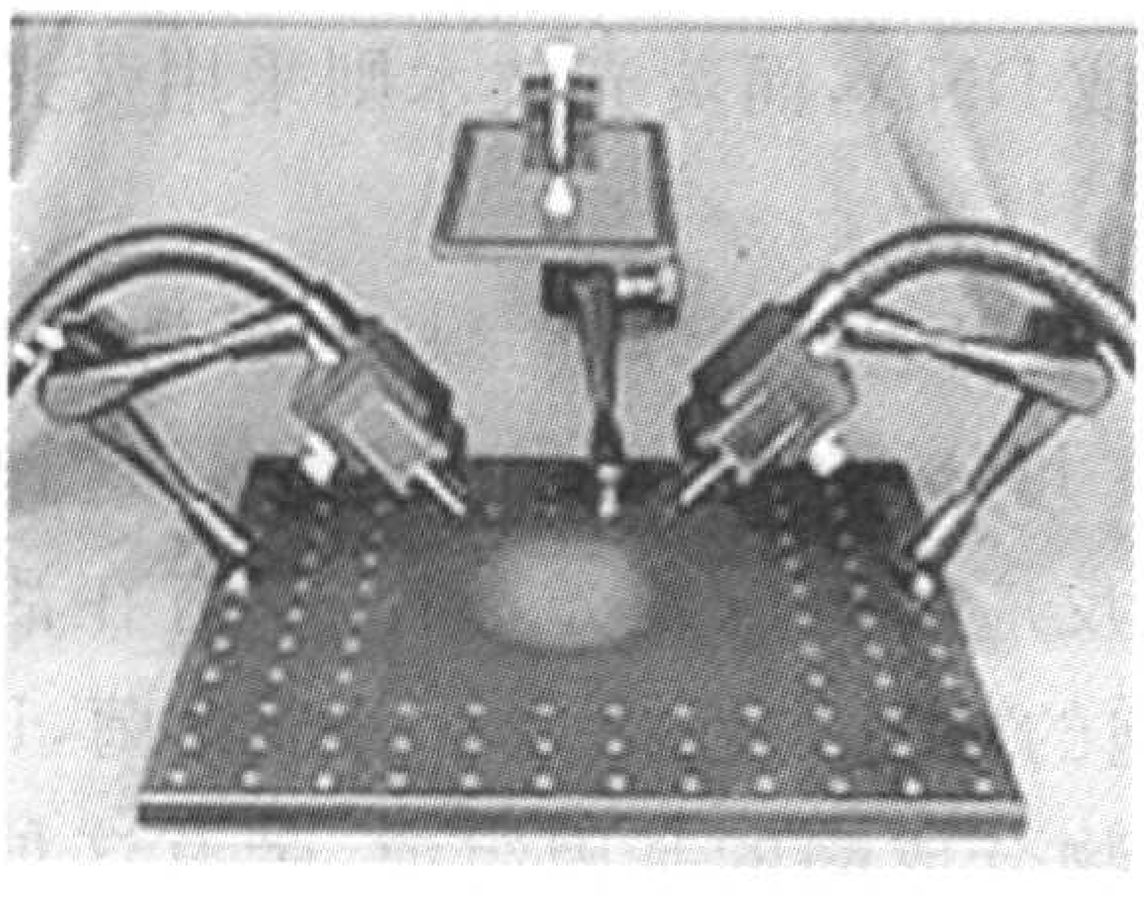


图 17-1 成像暗箱内的 CCD 镜头

（一）CCD 镜头

选择适当的 CCD 镜头（如图 17-1 所示），对于体内荧光成像是非常重要的。选用的 CCD 镜头对于波长大于 600nm 的光必须具有非常高的灵敏度和量子效率，而且由于需要探测的光源在皮下几厘米处，其噪声信号要尽可能的小。应用于生物发光检测的主要是电子计数加强型 CCD 镜头，它可以在噪音

很低的情况下精确计数到单个光子。尽管如此，大部分此类型 CCD 的量子效率在 450nm 时仅有 10%～15%，在 650nm 时减小到低于 1%。有些 CCD 在大于 600nm 时虽然有更高的量子效率，但其噪音很大并且其需要的冷却温度很低。怎样减少电子计数型 CCD 的噪音和获得更高的量子效率？更为合适的 CCD 是制冷型的背照射 CCD。因为暗电流是 CCD 的噪音，在冷却到 －105℃ 的条件下，暗电流可降低到一个可以忽略不计的程度，使体内发出的非常少的光子也能够检测到。以前的技术要达到 －105℃ 的低温需要液氮冷却，现在有更好的低温设备可以方便地达到此温度。制冷型背照射 CCD 的信噪比可以达到要求，例如信噪比为 10 时，读数噪音和暗电流达到可以忽略不计的程度，并且量子效率也有非常好的表现。

拍摄普通照片的和生物发光照片的是同一个 CCD 镜头，只不过曝光时间和快门不一样。

虽然镜头温度很低，但动物不会冻死。因为低温只是在 CCD 镜头的小环境内，其他范围内都是室温。

（二）成像暗箱

成像暗箱屏蔽宇宙射线及一切光源，可以使暗箱内部保持完全黑暗，CCD 所检测的光线完全由被检动物体内发出，避免了外界环境的光污染，如图 17-2 所示。

CCD 镜头位于暗箱的顶部，光线通过 50mm fl 的光圈被 CCD 收集。镜头下部是滤光镜的安装环，可以根据应用需要安装不同的滤光镜，扩展其光学成像能力。暗箱里的平台是由软件控制升降，通过升降可以在 5～10cm 范围内调节，并且带有加热装置，可以保持观察试验动物的体温（如图 17-2 所示）。

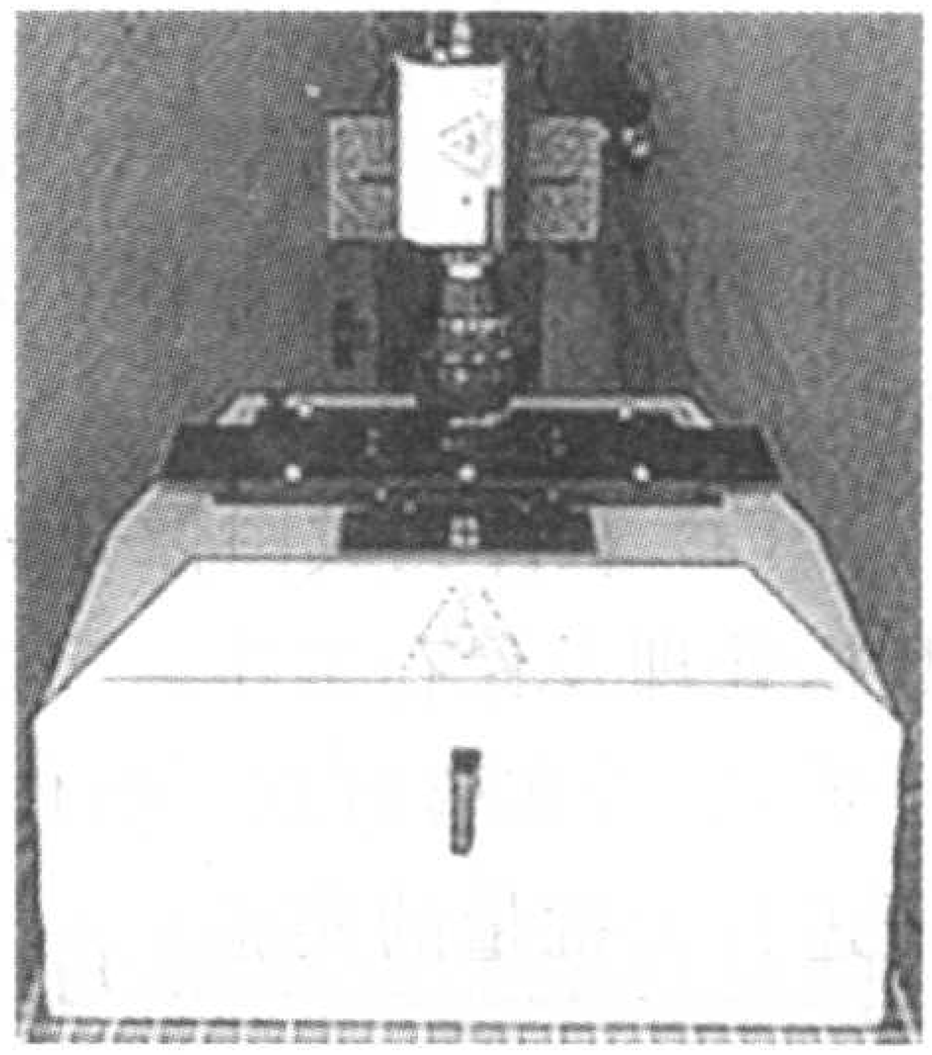


图 17-2　成像暗箱

（三）软件系统

软件系统负责仪器控制和图像分析。软件控制镜头的焦距、曝光时间、滤光镜的更换、照明灯的关启、平台的升降，具有非常好的用户界面，操作简便。

三、实验过程

（1）通过分子生物学克隆技术，应用单克隆细胞技术的筛选，将荧光素酶的基因稳定整合到预期观察的细胞的染色体内，培养出能稳定表达荧光素酶蛋白的细胞株。

（2）荧光素（通常的浓度是 150mg/kg）腹腔注射老鼠后约 1min 后表达荧光素酶的细胞开始发光，10min 后强度达到最高。在最高点持续约 20～30min 后开始衰落，大约 3h 后荧光素排除，发光全部消失，所以最好的检测时间是在注射后 15～25min

之间。如图 17-3 所示。

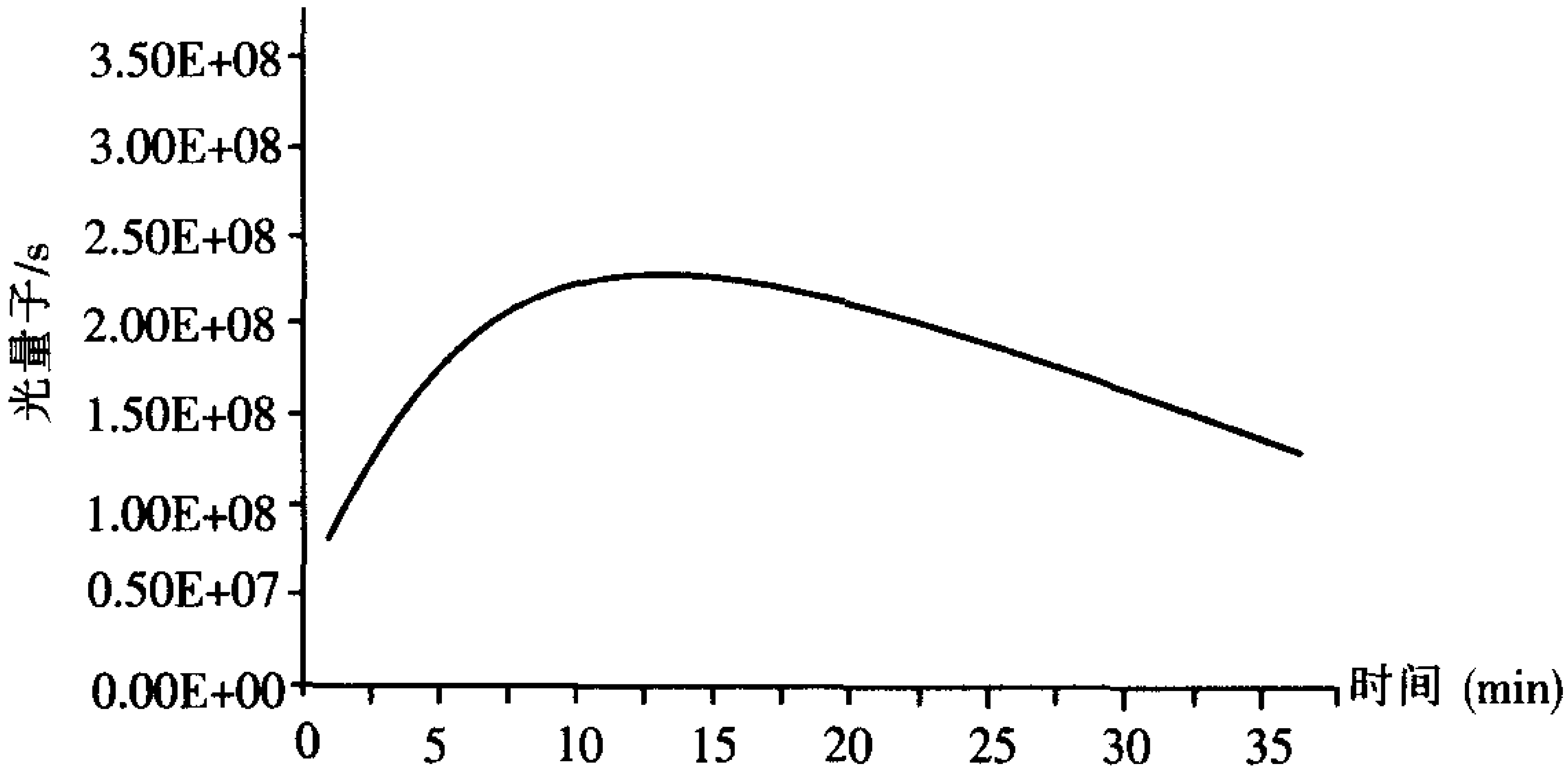


图 17-3 注射荧光素后，活体内表达荧光素酶发光的时间分布

(3) 小鼠经麻醉系统麻醉后被放入成像暗箱平台，软件控制平台的升降到一个合适的视野，自动开启照明灯拍摄第一次背景图。

(4) 自动关闭照明灯，在没有外界光源的条件下拍摄由小鼠体内发出的光，即为生物发光成像。与第一次的背景图叠加后可以清楚地显示动物体内光源的位置，完成成像操作。得到活体小鼠体内特定部位荧光的分布图像，如彩图 53 所示(见彩页 16)。

(5) 软件完成图像分析过程。使用者可以方便地选取感兴趣的区域进行测量和数据处理及保存工作。当选定需要测量的区域后，软件可以计算出此区域发出的光子数，获得实验数据。软件的数据处理和保存功能非常强大，可以加快实验速度，方便进行大批量的实验。

四、系统特性

相比较于其他活体生物体内成像技术，如超声(ultrasound)、计算机断层摄影(compnted tomography，CT)、核磁共振(magnetic resonance imaging，MRI)、正电子衍射成像(positron-emission tomography，PET)、单光子衍射(single-photon-emission computed tomography，SPECT)等技术，活体体内荧光成像技术的优点是：操作简便，测量快速(短于 5min)，可同时检测多个动物，费用低廉等。

(一) 定量分析

活体体内荧光成像技术采取绝对光子数的计算方法，记录单位时间内、单位面积、单位角度接受到的光子数。这样，不同时间、不同仪器的测量结果可以进行比较，具有绝对的定量意义。每一个新标记的细胞株都要进行全面的定量分析才能用于定量实验，其中包括在体外和体内固定位置细胞发光的标准曲线。

（二）仪器的解析度及分辨率

仪器的最高解析度在0.1mm左右。最新的仪器IVIS 200的最高解析度可达到60μm，在体外可观察到单个发光细胞。由于荧光是漫射光，在体内走的路线不是直线，所以该仪器对体内光源的分辨率不是很好，通过该仪器观察的发光图片不能代表发光物质的结构信息，在动物体表所捕捉的发光信号只能代表发光的强度和大概的位置。小动物CT和MRI在这方面具有优势，因为放射线走的路线很直。

（三）仪器对发光细胞检测的灵敏度与细胞发光的强度有关

在标记细胞活跃发光的情况下，仪器可以检测到最少100个皮下接种的发光细胞。若细胞在体内位置深（如原位种植），比如内脏，最少能检测到的细胞数目需要多一些。一般每增加0.5cm，可检测到的最少细胞数增加一个数量级。

（四）荧光检测与生物发光检测的优势与劣势比较

荧光发光需要激发光使得荧光基团达到较高的能量水平，然后发射出较长波长的发射光。两种常见的荧光蛋白为绿色荧光蛋白（GFP）和红色荧光蛋白（RFP）或DsRed，这些蛋白荧光局限于可见光400～650nm范围。但生物体内很多物质在受到激发光激发后，也会发出荧光，产生的非特异性荧光会影响到检测灵敏度。特别是当发光细胞深藏于组织内部，则需要较高能量的激发光源，也就会产生很强的背景噪音。生物发光成像相对于荧光成像，其灵敏度高。作为体内报告源，生物发光较之荧光的优点之一为不需要激发光的激发，它是因酶和底物的特异作用而发光，且动物体自身不会发光，这样生物发光就具有极低的背景。虽然荧光信号远远强于生物发光，但极低的自发光水平使得生物发光的信噪比远高于荧光。另外，生物发光信号可以方便计量，即便标记细胞在动物体内有复杂的定位，亦从动物体表的信号水平直接得出发光细胞的数量。而对于荧光，信号水平取决于发光细胞的数量及激发光的强度，光线穿过的组织对其有强烈的吸收，这使得荧光强度很难计量。由于荧光素酶在表达后快速合成并具有较短的寿命，而成为环境条件快速变化（如感染疾病）的反应探针。可根据两者所具有的特点以及实验要求如组织的光学条件（报告源的深度、体积及组织吸光度等），选择所适合的发光探针。

成体老鼠、裸鼠、幼鼠及胚胎的区别只在于对可见光的穿透性不同，一般可以看到成体正常老鼠的体内发光，这正是这项技术的价值所在。可见光的穿透能力在3～4cm，所以大鼠也可以作为活体成像的动物，并有很多关于大鼠的文献报道。

若有发光足够强的标记细胞，在老鼠体内任何一个地方都能看到约一立方毫米的细胞瘤（约10^6个细胞）。穿透性可达到3～4cm。

（五）荧光素酶基因、荧光素酶、荧光素底物易透过血脑屏障

荧光素酶有554个氨基酸，分子量约50kDa。荧光素酶的底物荧光素，分子量约280Da。荧光素的水溶性和脂溶性都非常好，很容易穿透细胞膜和血脑屏障。

（六）荧光素酶的稳定性

荧光素酶基因是插到细胞染色体内的，当细胞分裂、转移、分化时，荧光素酶也会得到持续稳定的表达。荧光素酶的半衰期约 3h，所以只有活细胞才能够持续表达荧光素酶。

（七）标记细胞与标记基因所用的启动子

标记细胞一般用来标记细胞内稳定表达的启动子，从而显示细胞的数目。标记基因一般用特异的基因启动子，与该基因平行表达，显示启动子对应基因的表达活性。

（八）荧光素酶的表达高低与所用启动子的活性有关

启动子的活性高，则荧光素酶的表达高，启动子的活性低，则荧光素酶的表达低。还可以根据此原理，用特定的启动子驱动荧光素酶，来观察该启动子在活体动物体内的特定条件下的表达情况，并检测影响该启动子表达的因素。这正体现了应用活体成像技术研究的优势。

（九）荧光素酶与绿色荧光蛋白(GFP)的比较

荧光素酶的偏红光比绿色荧光蛋白(GFP)的绿光在体内的穿透性要强近一百倍。因为荧光素酶是靠酶和底物的相互反应发光，特异性很强，得到的信号信噪比很高。而荧光蛋白需要激发光来产生发射光。老鼠的毛皮、肌肤以及一些食物都会产生非特异性荧光，造成很强的非特异性背景光，得到的信号信噪比很小。虽然荧光蛋白的发光强度很高，大量应用于体外检测，但荧光酶标记的方法更适合于体内检测。荧光酶体内检测的灵敏度要比荧光蛋白在体内的灵敏度至少高三个数量级(1 000 倍)。

（十）荧光成像功能

荧光发光是通过激发光激发荧光基团到达高能量状态，而后产生发射光。常用的有绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白 DsRed 及其他荧光报告基团，标记方法与体外荧光成像相似。荧光成像具有费用低廉和操作简单等优点。同生物发光在动物体内的穿透性相似，红光的穿透性在体内比蓝绿光的穿透性要好得多，近红外荧光为观测生理指标的最佳选择。

IVIS 系统可检测波长范围 400～950nm 的荧光，通过六块不同的激发光滤镜获得所需的特定激发光波长。光线通过第二块蓝色漂移背景光滤镜(blue-shifted background filters)，使得初始的激发光产生轻微的蓝色漂移。以不同波长的激发光，在不激发荧光报告基团时激发组织的自发荧光，从而将靶信号与背景光区分开，消除自发荧光。

虽然荧光信号远远强于生物发光，但非特异性荧光产生的背景噪音使其信噪比远远低于生物发光。虽然许多公司采用不同的技术分离背景光，但是受到荧光特性的限制，很难完全消除背景噪音。这些背景噪音造成荧光成像的灵敏度较低。目前

在大部分高水平的文章中还是应用生物发光的方法来研究活体动物体内成像。但是，荧光成像有其方便、便宜、直观、标记靶点多样和易于被大多数研究人员接受的优点，在一些植物分子生物学研究和观察小分子体内代谢方面也得到应用。对于不同的研究，可根据两者的特点以及实验要求，选择合适的方法。最近许多文献报道的实验中，利用绿色荧光蛋白和荧光素酶对细胞或动物进行双重标记，用成熟的荧光成像技术进行体外检测，进行分子生物学和细胞生物学研究，然后利用生物发光技术进行动物体内检测，进行活体动物体内研究。

五、应　　用

通过活体体内荧光成像系统，可以观测到疾病或癌症的发展进程以及药物治疗所产生的反应，并可用于病毒学研究、构建转基因动物模型、siRNA 研究、干细胞研究、蛋白质相互作用研究以及细胞体外检测等领域。具体应用如下：

（一）标记细胞

1. 癌症与抗癌药物研究

直接快速地测量各种癌症模型中肿瘤的生长和转移，并可对癌症治疗中癌细胞的变化进行实时观测和评估。活体体内荧光成像能够无创伤地定量检测小鼠整体的原位瘤、转移瘤及自发瘤。活体体内荧光成像技术提高了检测的灵敏度，即使微小的转移灶也能被检测到(可以检测到体内 10^2 个细胞的微转移)。目前已商品化的肿瘤细胞株包括：前列腺癌、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、子宫颈癌和结肠癌等 BiowareTM 细胞系模型。

2. 免疫学与干细胞研究

将荧光素酶标记的造血干细胞移植入脾及骨髓，可用于实时观测活体动物体内干细胞造血过程的早期事件及动力学变化。有研究表明，可应用带有生物发光标记基因的小鼠淋巴细胞，检测放射及化学药物治疗的效果，寻找在肿瘤骨髓转移及抗肿瘤免疫治疗中复杂的细胞机制。应用可见光活体成像原理标记细胞，建立动物模型，可有效地针对同一组动物进行连续地观察，节约动物样品数，同时能更快捷地得到免疫系统中病原的转移途径及抗性蛋白表达的改变。

3. 细胞凋亡

当荧光素酶与抑制多肽以融合蛋白形式在哺乳动物细胞中表达，产生的融合蛋白无荧光素酶活性，细胞不能发光，而当细胞发生凋亡时，活化的 Caspase 3 在特异识别位点切割去掉抑制蛋白，恢复荧光素酶活性，产生发光现象，由此可用于观察活体动物体内的细胞凋亡相关事件。

（二）标记病毒

以荧光素酶基因标记的 HSV-1 病毒为例，可观察到 HSV-1 病毒对肝脏、肺、脾及淋巴结的侵染和病毒从血液系统进入神经系统的过程。多种病毒，如腺病毒、腺相

关病毒、慢性病毒、乙肝病毒等已被荧光素酶标记,用于观察病毒对机体的侵染过程。

(三)标记细菌

1. 细菌侵染研究

可以用标记好的革兰氏阳性和阴性细菌侵染活体动物,观测其在动物体内的繁殖部位、数量变化及对外界因素的反应。

2. 抗生素药物

利用标记好的细菌在动物体内对药物的反应,医药公司和研究机构可用这种成像技术进行药物筛选和临床前动物实验研究。近年来,国际上大型制药公司纷纷将活体体内荧光成像技术在动物体内的实验结果作为FDA(美国食品和药品检验局)药物申报材料中非常重要的临床前动物实验部分。

(四)基因表达和蛋白质相互作用

1. 基因表达

为研究目的基因是在何时、何种刺激下表达,将荧光素酶基因插入目的基因启动子的下游,并稳定整合于实验动物染色体中,形成转基因动物模型,利用其表达产生的荧光素酶与底物作用产生生物发光,反映目的基因的表达情况,从而实现对目的基因的研究。这可用于研究动物发育过程中特定基因的时空表达情况,观察药物诱导特定基因表达,以及其他生物学事件引起的相应基因表达或关闭。

2. 组织特异性基因表达

荧光素酶(luciferase)是一类生物发光酶,其中的renilla荧光素酶和firefly荧光素酶分别识别不同的底物,一种细胞可被这两种荧光素酶标记:renilla荧光素酶基因由一组成性稳定表达的启动子驱动,作为内参,反应细胞数量的变化;firefly荧光素酶基因由要研究的组织特异性启动子驱动。这样firefly荧光素酶发光信号的变化,在消除细胞数量变化的影响后就可反映特定的启动子在动物体内的表达活性。

3. 蛋白质相互作用

观察细胞中或活体动物体内两种蛋白质的相互作用,是将荧光素酶基因分成两段,分别连接所研究的两种蛋白之一的编码DNA,然后导入细胞或动物体内表达为融合蛋白。当两种蛋白有强相互作用时,表达的荧光素酶两部分相互靠近形成有活性的荧光素酶,在有底物存在时出现生物发光,反映出所研究的两种蛋白存在相互作用。此原理亦可用于研究细胞信号传导途径。

4. 阻断RNA

通过对比生物发光的变化,验证在成年小鼠体内注射双链siRNA可以特异地阻遏基因表达。

5. 基因治疗

基因治疗包括在体内将一个或多个感兴趣的基因及其产物安全而有效地传递到靶细胞。可应用荧光素酶基因作为报告基因用于载体的构建,观察目的基因是否能够在试验动物体内持续高效和组织特异性表达。这种非侵入方式具有容易准备、低

毒性及轻微免疫反应的优点。荧光素酶基因也可以插入脂质体包裹的DNA分子中，用来观察脂质体为载体的DNA运输和基因治疗情况。

（五）制作动物模型

研究者根据研究目的，将靶基因、靶细胞、病毒及细菌进行荧光素酶标记，同时转入动物体内形成所需的疾病模型，包括肿瘤、免疫系统疾病、感染疾病等。可提供靶基因在体内的实时表达和对候选药物的准确反应，还可以用来评估候选药物和其他化合物的毒性。为药物在疾病中的作用机制及效用提供研究方法。

六、发展前景

活体体内荧光成像技术是检验实验动物体内分子及细胞的强有力手段，正在被越来越广泛地应用于医学及生物学研究领域。相对于其他非侵入性观察手段，如PET等，活体体内荧光成像技术以其极高的检测灵敏度及低廉的实验费用，可以在极短的时间内应用尽可能少的动物数精确得到预期的实验结果，为研究者提供了广阔的应用空间。通过对感染过程的观察，可以实时地提供关于疾病过程的新信息，或发现前所未知的新致病点。将这种高灵敏度、高精确性的观察方法与结构成像技术(如CT)相结合，是该项技术的一个发展方向，将会在观测到结构信息的同时，获得功能性信息。另外，还可以利用计算机控制的扫描激光将不同光线投射到动物体表，这些光线投射后发生偏转，从而度量动物体表各处的高度。由数码相机成像，用活体成像软件汇总影像信息，从而得出动物体表的拓扑信息。这些信息可用于对动物体表三维拓扑图像的重组。随着小鼠及人类基因组图谱的绘制完成，可以应用生物发光为信号，在转基因鼠体内研究特定基因的表达情况，从而了解其功能。因此，活体体内荧光成像技术在基础科学研究及药物研究领域中将有宽广的发展空间。

第十八章　流式细胞仪

流式细胞仪(flow cytometr,FCM)又称为荧光激活细胞分选器(fluorescent activated cell sorter,FACS),是一种通过测量细胞标记的荧光,对单个细胞或其他生物颗粒进行快速、准确、客观定量分析和分选的一门技术;是在单个细胞分析和分选基础上发展起来的对细胞的物理和化学性质(如细胞大小、内部结构),以及 DNA、RNA、蛋白质、抗原等进行快速测量并可分类收集的高级精密仪器。它每秒钟可以检测上万个细胞,具有高灵敏度、高分辨率、高重复性、高分选纯度和多信息分析的综合优势。它集电子技术、计算机技术、激光技术、流体理论于一体,是目前分析细胞学中最具有代表性的先进的检测仪器之一。

第一节　概　　述

世界上最早试图使细胞检测自动化的人是 Moldaven,他在 1934 年就尝试用光电仪记录流过一根毛细管的细胞。1936 年,Caspersson 等引入显微光度术。1940 年,Coons 提出用结合了荧光素的抗体去标记细胞内的特定蛋白。1947 年,Guclcer 运用层流和湍流原理研制烟雾微粒计数器。1949 年,Wallace Coulter 申请了在悬液中计数粒子的方法的专利。1950 年,Caspersson 用显微分光光度计的方法在紫外光(UV)和可见光光谱区检测细胞。1953 年,Croslannd Taylor 应用分层鞘流原理,成功地设计了红细胞光学自动计数器。同年,Parker 和 Horst 设计了一种全血细胞计数器装置,成为流式细胞仪的雏形。1954 年,Beirne 和 Hutcheon 发明光电粒子计数器。1965 年,Kamemtsky 等提出两个设想:一是用分光光度计定量细胞成分;二是结合测量值对细胞分类。1967 年,Kamentsky 和 Melamed 在 Moldaven 的方法的基础上提出细胞分选的方法。1969 年,Van Dilla,Fulwyler 及其同事们在国际流式细胞术资源实验室发明了第一台荧光检测细胞计。1972 年,Herzenberg 研制出一个细胞分选器的改进型,它能够检测出经过荧光标记抗体染色的细胞的较弱的荧光信号。1973 年,BD 公司与美国斯坦福大学合作,研制开发并生产了世界上第一台商用流式细胞仪 FACS I。从此,许多厂家不断研制生产出自己的流式细胞仪,流式细胞术进入了一个空前飞速发展的时代。

20 世纪 80 年代是流式细胞仪的商品化时期,在这期间不断有新型号的仪器推

出，在多参数检测技术上不断提高。进入20世纪90年代，随着微电子技术特别是计算机技术的发展，计算能力不断提高，流式细胞仪的功能也越来越强大。在数据管理、数据分析方面有了长足的进步。

在现代流式细胞术中，由于结合了单克隆抗体技术、定量细胞化学和定量荧光细胞化学，使用了新的荧光探针、新的染色方法，流式细胞技术在新的细胞参数分析方面日益发展，在生命科学、临床医学、药物学等研究领域中得到越来越多的应用。

从最新推出的仪器看，流式细胞仪在硬件上不断更新，采用更新的器件（如半导体激光、大规模集成电路），以实现小型化；用数字电路取代模拟电路，充分发挥微处理器的功能以实现简单化；在软件上提高数据自动分析能力，充分发挥图形界面的优点，使操作更简便。

流式细胞仪分为两大类：

第一类为台式机，其特点为仪器的光路调节系统固定，自动化程度高，操作简便，易学易掌握。BD公司的临床型FCM FACScan也是最早获得美国FDA批准可用于临床诊断的仪器。

第二类为大型机，其特点为可快速将所感兴趣的细胞分选出来，并且可将单个或指定个数的细胞分选到特定的培养孔或板上，同时可选配多种波长和类型的激光器，适用于更广泛的科学研究应用。

图18-1是BD公司FACSAria流式细胞仪，它具有分选速度快、多参数分析的新特点。

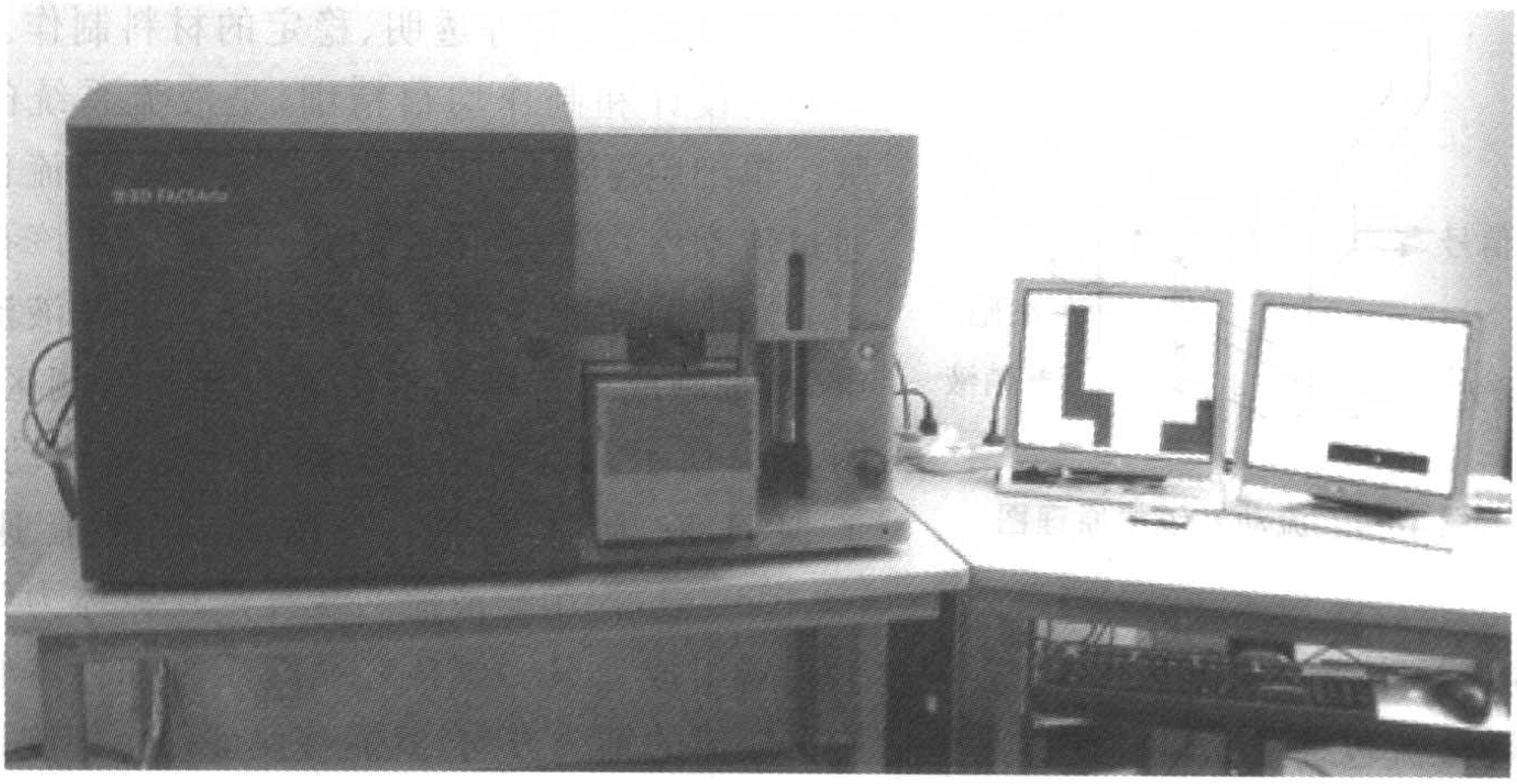


图18-1 BD FACSAria 流式细胞仪

第二节 工作原理与基本构成

一、工作原理

将经荧光染色或标记的单细胞悬液放入样品管中，用高压将其压入流动室内。流动室内充满鞘液，在鞘液的包裹和推动下，细胞被排成单列，以一定速度从流动室喷嘴喷出。在与细胞液流呈 90°方向上，激光束照射液流，使细胞产生散射光和荧光。通过光学系统检测并接收这些光学信号，同时转换成电脉冲信号。电脉冲信号经过计算机处理，得出每个细胞的多种信息参数。

二、基本构成

流式细胞仪主要由流动室及液流驱动系统，激光光源及光束形成系统，光学系统，信号检测与存储、显示、分析系统，细胞分选系统这五大部分组成。

（一）流动室和液流驱动系统

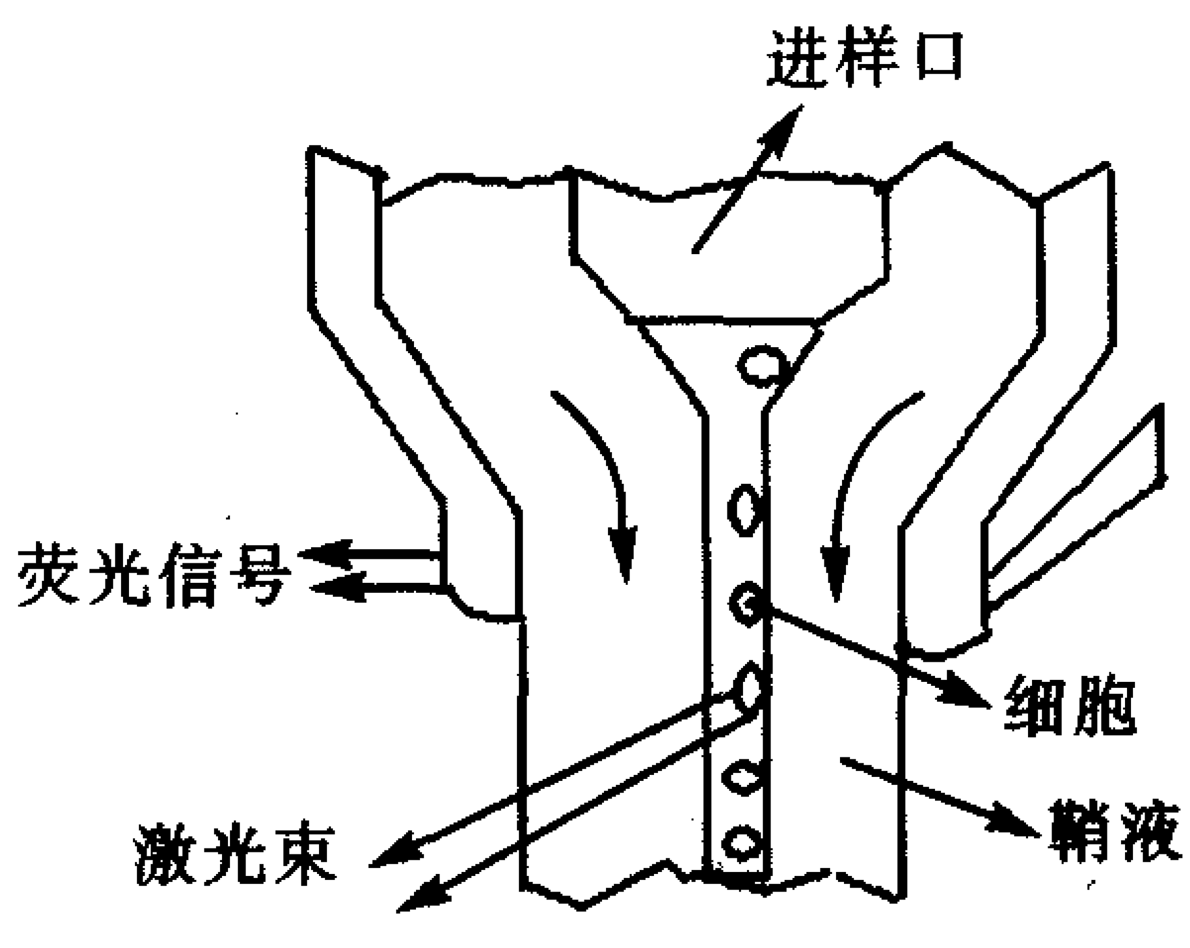


图 18-2 流动系统的原理图

流动室由样品管、鞘液管和喷嘴等组成，常用光学玻璃、石英等透明、稳定的材料制作。流动室的设计和制作均很精细，是液流系统的心脏。单细胞悬液在细胞流动室里被鞘液流包围通过流动室内一定孔径的孔（检测区在该孔的中心），细胞在此与激光垂直相交。在鞘液流约束下，细胞成单行排列依次通过激光检测区，如图 18-2 所示。流动室里的鞘液流稳定流动（为了保证液流是稳液，一般限制液流速度 $v<10m/s$），控制鞘液流的装置是在流体力学理论的指导下由一系列压力系统、压力感受器组成。只要调整好鞘液压力和标本管压力，鞘液流包绕样品流并使样品流保持在液流的轴线方向，就能够保证每个细胞通过激光照射区的时间相等，从而使激光激发的荧光信息准确无误。流动室孔径有 60μm、100μm、150μm、250μm 等多种，供研究者选择。小型仪器一般固定装置了一定孔径的流动室。

（二）激光光源与光束成形系统

目前台式机 FCM 大多采用氩离子气体激光器，BD 公司的 FACSCalibur 可增配小功率半导体激光器（波长 635nm），从而拓宽了其染料的应用范围。

激光是一种相干光源，它能提供单波长、高强度及稳定性高的光照，是细胞微弱荧光快速分析的理想光源，这是因为由于细胞的快速流动使每个细胞经过光照区的时间仅为 1μs 左右，而每个细胞所携带荧光物质被激发出的荧光信号强弱与被照射的时间和激发光的强度有关，因此激光必须达到足够的光照强度。激光光束在到达流动室前，先经过透镜，将其聚焦，形成几何尺寸约为 22μm×66μm 即短轴稍大于细胞的直径的光斑，这种椭圆形光斑激光能量分布属正态分布。为保证样品中每个细胞是分别受到光照并且受照强度十分一致，须将样本流与激光束正交且相交于激光能量分布峰值处。台式机 FCM 的光路调节对用户是封闭的，即安装时由工程师调试完毕后，无需用户做任何调节，所以用户操作十分方便。

（三）光学系统

流式细胞仪的光学系统由若干组透镜、小孔、滤光片组成，大致可分为流动室前和流动室后两组。流动室前的光学系统由透镜和小孔组成，透镜和小孔（一般为 2 片透镜、1 个小孔）的主要作用是将激光光源发出的横截面为圆形的激光光束聚焦成横截面较小的椭圆形激光光束，使激光能量成正态分布，使通过激光检测区的细胞受照强度一致，最大限度地减少杂散光的干扰；流动室后的光学系统主要由多组滤光片组成，滤光片的主要作用是分离不同波长的荧光信号，然后由相应的光电倍增管检测。

流式细胞仪通常以激光作为激发光源。经过聚焦整形后的光束，垂直照射在样品流上，荧光染色的细胞在激光束的照射下，产生散射光和激发荧光。这两种信号同时被前向光电二极管和 90°方向的光电倍增管接收。荧光信号的接收方向与激光束垂直，经过一系列二向色性反射镜和带通滤光片的分离，形成多个不同波长的荧光信号。如图 18-3 所示，当激光器发出的光经过聚焦透镜整合，照到细胞流上，细胞除发出前散射光和侧散射光外还发出不同颜色的荧光，分别被不同探测通道检测，得到相

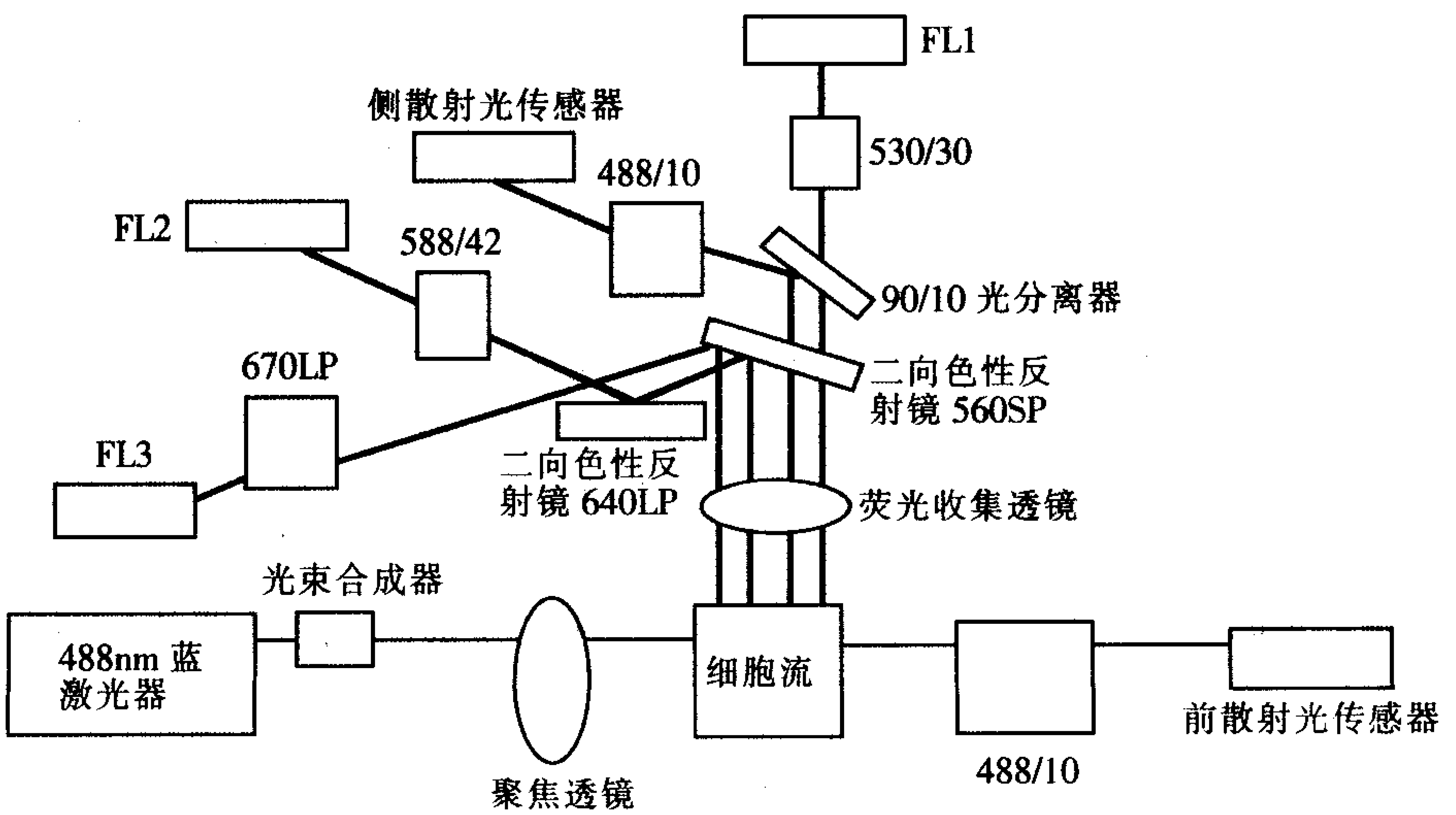


图 18-3　光学系统的原理

应的参数信息。

在 FCM 的光学系统中主要光学原件是滤光片(Filter),主要分为三类:

(1) 长通滤片(longpass filter,LP):长通滤片使特定波长以上的光通过,特定波长以下的不通过。如 LP500 滤片,将允许 500nm 以上的光通过,而 500nm 以下的光吸收或返回。

(2) 短通滤片(shortpass filter,SP):与长通滤片相反,特定波长以下的光通过,特定波长以上的光吸收或返回。

(3) 带通滤片(bandpass filter, BP):带通滤片可允许相当窄的一波长范围内光通过,一般滤片上有两个数,一个为允许通过波长的中心值,另一为允许通过光波段的范围。如 BP 500/50 表示其允许通过波长范围为 475～525nm。

(四) 信号检测与存储、显示、分析系统

当细胞携带荧光素标记物，通过激光照射区时受到激发，产生不同波长的、代表细胞内不同物质的荧光信号。荧光信号由光电接收器接收，转变为电信号，表征为电压脉冲的高度、面积和宽度。电脉冲信号经 A/D 转换成数字信号并传送到计算机，进行储存、作图、统计分析。经荧光染色的细胞受合适的光激发后所产生的荧光是通过光电转换器转变成电信号而进行测量的。光电倍增管(PMT)最为常用，它的响应时间短，仅为 ns 数量级，而且光谱响应特性好，在 200～900nm 的光谱区，光量子产额都比较高。PMT 的增益从 10^3 到 10^8 可连续调节，因此对弱光测量十分有利。PMT 运行时特别要注意稳定性问题，工作电压要十分稳定，工作电流及功率不能太大。一般功耗低于 0. 5W，最大阳极电流在几个毫安。此外要注意对 PMT 进行暗适应处理，并注意需要良好的磁屏蔽。在使用中还要注意安装位置不同的 PMT，因为光谱响应特性不同，不宜互换。也有用硅光电二极管的，它在强光下稳定性比 PMT 好。从 PMT 输出的电信号仍然较弱，需要经过放大后才能输入分析仪器。流式细胞仪中一般备有两类放大器。一类是输出信号幅度与输入信号成线性关系，称为线性放大器。线性放大器适用于在较小范围内变化的信号以及代表生物学线性过程的信号，例如 DNA 测量等。另一类是对数放大器，输出信号和输入信号之间成常用对数关系。在免疫学测量中常使用对数放大器。因为在免疫分析时常要同时显示阴性、阳性和强阳性三个亚群，它们的荧光强度相差 1～2 个数量级；而且在多色免疫荧光测量中，用对数放大器采集的数据易于解释。此外对数放大器还有调节便利、细胞群体分布形状不易受外界工作条件影响等优点。

流式细胞仪测定常用的荧光染料有多种,它们分子结构不同,激发光谱和发射光谱也各异。必须依据流式细胞仪所配备的激光光源的发射光波长选择荧光染料,如氩离子气体激光管,它的激发光波长 488nm,氦氖离子气体激光管激发光波长 633nm。488nm 激光光源常用的荧光染料有 FITC(异硫氰酸荧光素)、PE(藻红蛋白)、PI(碘化丙啶)、CY5(化青素)、preCP(叶绿素蛋白)、ECD(藻红蛋白-德克萨斯

红)等。它们的激发光和发射光波长分别如表 18-1 所示：

表 18-1　流式细胞仪常用荧光染料的激发光和发射光波长

荧光染料	激发光波长(nm)	发射光峰值(nm)
FITC	488	525
PE	488	575
PI	488	630
ECD	488	610
PE-CY5	488	667
PreCP	488	675

各种荧光信号由各自的光电倍增管(PMT) 接收并转变为电信号后存储在流式细胞仪的计算机硬盘或软盘内。

(五) 细胞分选系统

如在细胞流动室上装有超声压电晶体,通电后超声压电晶体发生高频震动,可带动细胞流动室高频震动,使细胞流动室喷嘴流出的液流束断成一连串均匀的液滴，每秒钟形成上万个液滴。每个液滴中包含着一个样品细胞,当含细胞的液滴逐个通过激光束时,受到两种检测器的检测:如果液滴中含有细胞就会激活干涉检测器(interference detector),只有带有荧光标记细胞的液滴才会激活荧光检测器(fluorescence detector)。当带有荧光标记的液滴通过激光束时,将两种检测器同时激活,引起液滴充电信号,使鞘液带上负电荷。由于液滴带有负电荷,移动时就会向正极移动,进入到荧光标记细胞收集器中,如图 18-4 所示。

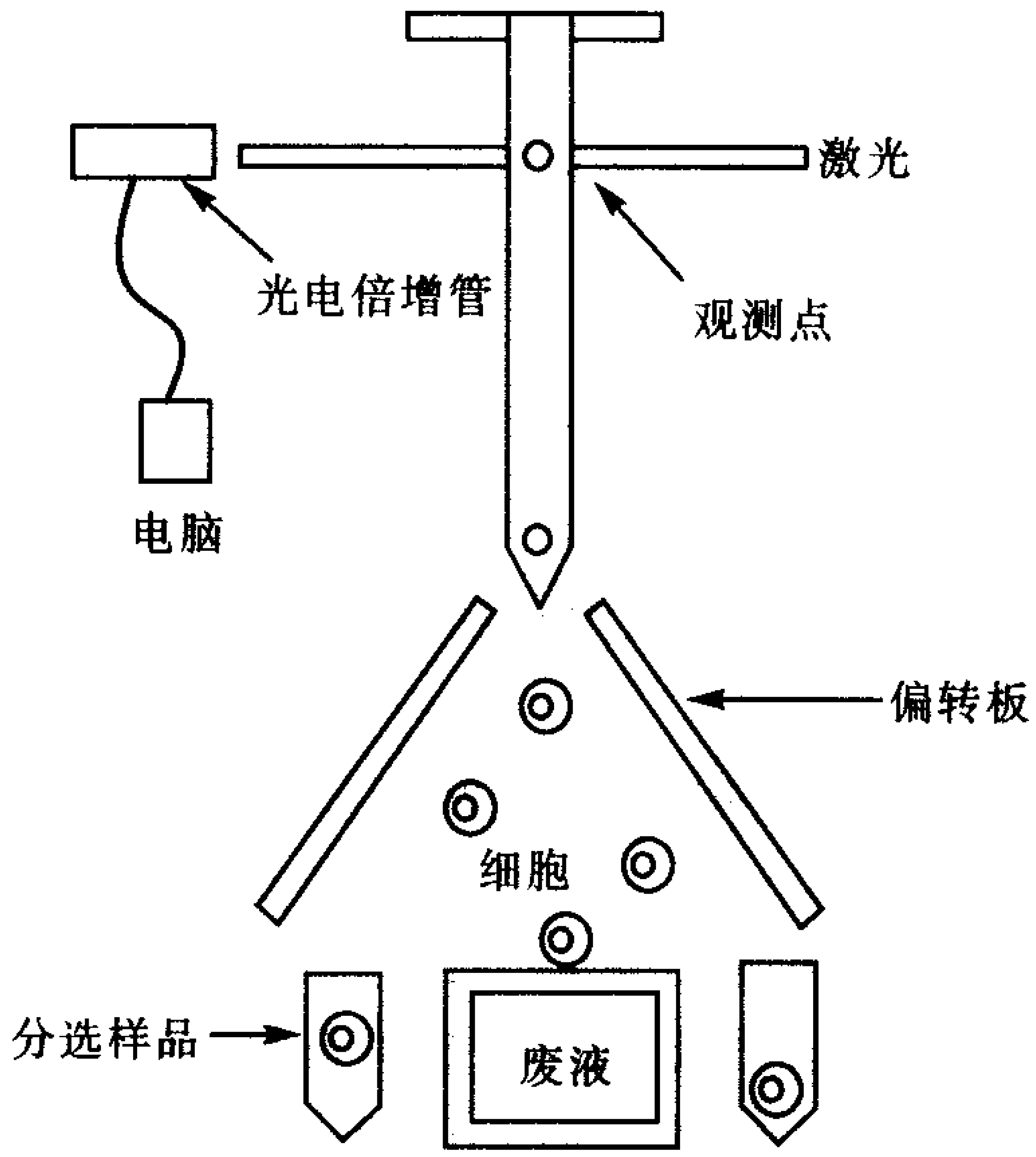


图 18-4　细胞分选原理图

第三节　主要用途

一、细胞周期和 DNA 倍体分析

G_0G_1 期的细胞 DNA 含量为二倍体，G_2M 期 DNA 含量是四倍体，而 S 期细胞的 DNA 含量在二者之间。用流式得到直方图，第一个峰是 G_0G_1 期，第二个峰是 G_2M 期，两峰之间为 S 期细胞，如图 18-5 所示。

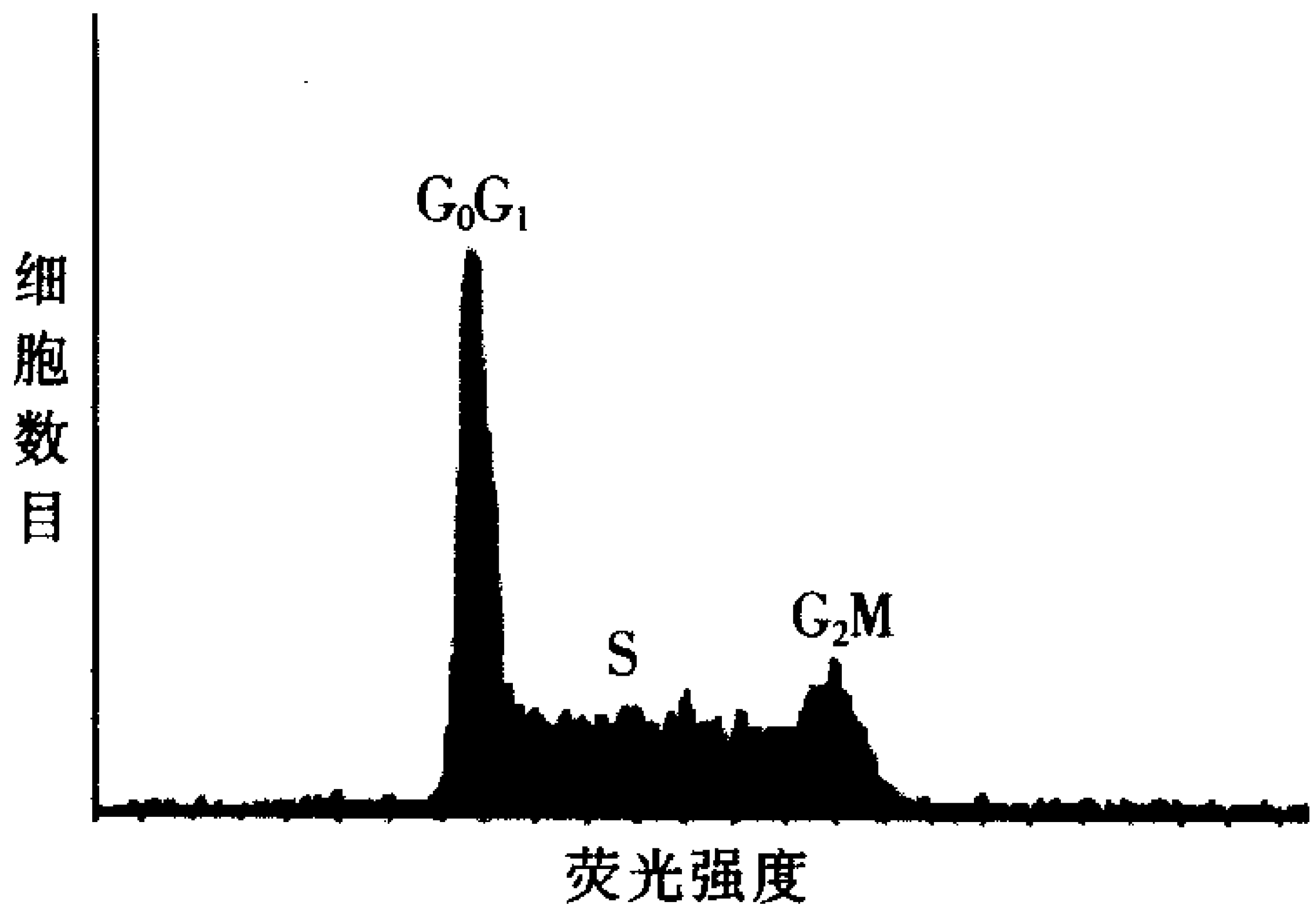


图 18-5　流式细胞仪细胞周期图

细胞周期分析主要用于几个领域：

1. *肿瘤学方面*

肿瘤细胞异倍体出现，S 期和 G_2M 期细胞比例增高，常成为肿瘤恶化的一个标志。

2. *细胞凋亡研究*

凋亡是主动性死亡，其形态学变化包括细胞皱缩，染色质致密固缩，核碎裂，形成凋亡小体。凋亡细胞在细胞周期分析中显示 G_0G_1 峰前出现一个小于二倍体含量的小峰，为凋亡峰。

3. *抗肿瘤药物筛选*

将 $G_1 \rightarrow S$ 期阻断，可能控制肿瘤细胞的增生。目前采用的抗肿瘤药物大多作用于这一时期，影响肿瘤细胞在周期中的进程。

二、细胞凋亡与坏死的检测

1. PI *单染*

区别凋亡和坏死细胞的最常用染料。

2. *吖啶橙*(AO)*和* EB *双染*

正常细胞，AO 染色为强绿色，EB 染色为弱红色；凋亡细胞，AO 染色为阳性，EB 染色度轻度增加；坏死细胞，EB 染色明显增强，AO 却变暗(EB 诱导其淬灭)。

3. PI/FDA *方法*

荧光素乙酸盐(FDA)，本身不是荧光染料，但可以被活细胞摄取，并由细胞内的乙酸酶水解，水解后的产物荧光素贮存于细胞内显示很强的荧光。当细胞同 PI 和

FDA 孵育后，活细胞为绿色荧光素标记，死细胞为 PI 染色。

4. Heo/PI 双染

死细胞能被这两种染料着色，活细胞不能被这两种染料着色，凋亡细胞只能染上 Heo。

5. Annexin-V/PI 双染

活细胞为(Annexin-V-/PI-)；坏死细胞为(Annexin-V+/PI+)；凋亡早期细胞为(Annexin-V+/PI-)。

三、染色体分析

通过对染色体 DNA 含量分析，得到染色体频率分布图，同类型染色体出现一个峰，峰下的面积代表这种类型染色体的密度。

四、细胞表面标志的检测

利用抗原抗体特异性结合的原理，检测细胞表面的标志物。

五、淋巴细胞亚群分析

检测原理：利用各种单克隆抗体与淋巴细胞表面的抗原结合，再配合多色荧光染料，即可以把各种不同的淋巴细胞亚群分离开来。如图 18-6 所示，图中 FSC 代表前散射光，SSC 表示侧散射光，CD45、CD14 代表细胞表面标记分子。

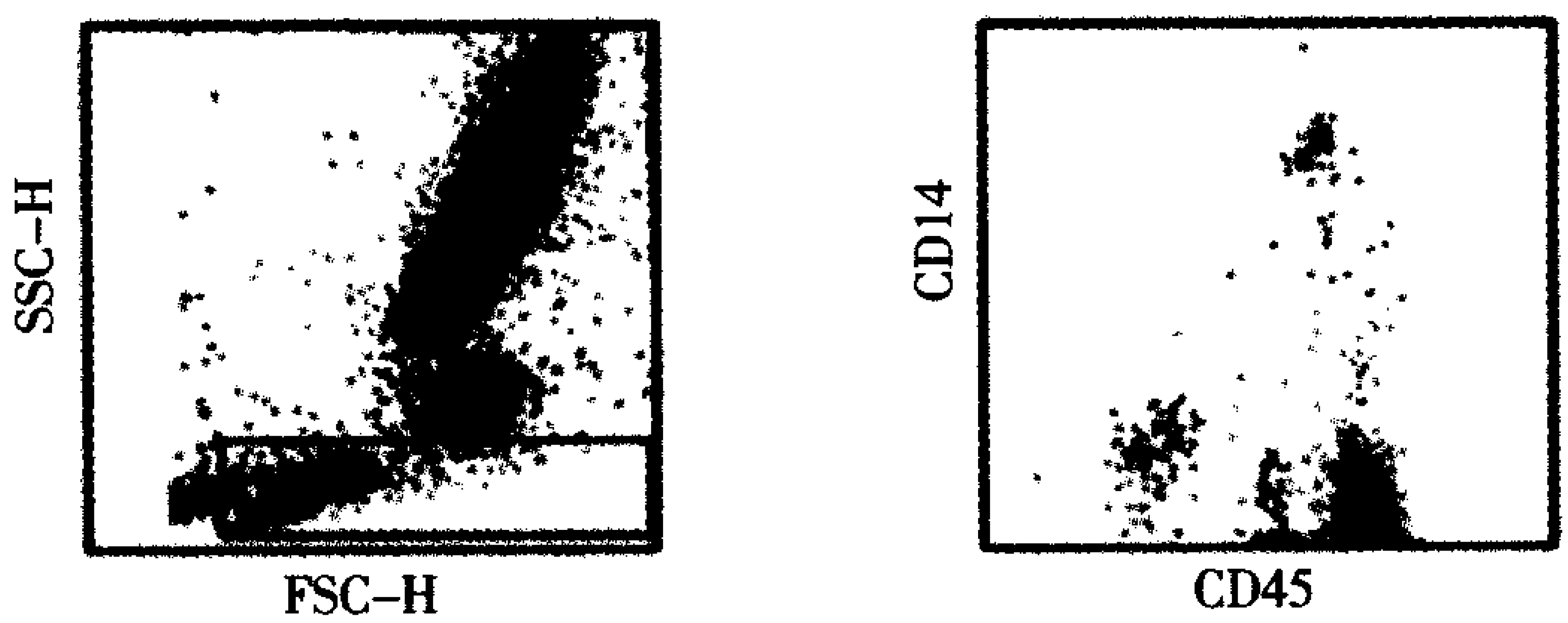


图 18-6　淋巴细胞亚群分析结果图

六、胞内蛋白的检测

机体内许多细胞在受到外界刺激后会分泌细胞因子。用流式细胞仪检测细胞因子的含量，可以部分反映细胞的功能。在给一定的刺激剂增加细胞因子的分泌后更

易用流式细胞仪检测到。

七、细胞的分选

可以在无菌条件下，把感兴趣的细胞分选出继续培养，做更深入的研究。

第四节　检测样品的制备

一、直接标记细胞表面分子

(1) 将细胞样本制成单细胞悬液，悬液内不能有粘集、团块。

(2) 调整细胞浓度为(5×10^5)～(1×10^6)个，用 PBS 洗两次，用 100μL PBS 重悬细胞。

(3) 加入适量 Fc 受体阻断剂(与抗体匹配的动物的血清或 IgG)，4℃避光放置 30min。

(4) 加入适量的特异性表面标记荧光抗体或独特型对照抗体，4℃避光放置 30min。

(5) 用 PBA(PBS+0.5%叠氮钠)洗两遍，用 400μL PBA 重悬细胞，上机检测。

二、检测细胞内信号分子

(1) 收集细胞，用 PBS 洗一遍，计数，用无血清培养基调至细胞浓度为 1×10^6 个/mL。

(2) 取 1mL 加入 EP 管中，离心，弃上清。

(3) 用 100μL 固定液重悬细胞，常温避光放置 20min。

(4) 用 PBS 洗去固定液。

(5) 用－20℃预冷的 90%甲醇或穿膜液重悬细胞沉淀，4℃避光孵育 10min。

(6) 用 PBS 洗一遍，弃上清，加 200μL 穿膜液重悬细胞，常温避光放置 10min。

(7) 用 PBS 洗一遍，弃上清，加 100μL 穿膜液重悬细胞，加入适量一抗或独特型对照抗体，4℃避光孵育 30min。

(8) 用 PBS 洗两遍，用 100μL PBS 重悬细胞，加入适量特异性荧光标记二抗，4℃避光孵育 30min。

(9) 用 PBS 洗两遍，用 400μL PBS 重悬细胞，上机检测。

三、用PI单染检测细胞周期

(1) 将细胞制成单细胞悬液。

(2) 将细胞悬液快速注射到4℃预冷的70%乙醇中,吹打均匀,固定24h。

(3) 1 500rpm离心10min,弃上清,加PBS悬浮吹打。

(4) 计数,调整细胞浓度至1×10^6个/mL。

(5) 加入RNA酶约0.5mL,37℃孵育30min。

(6) 1 500rpm离心10min,弃RNA酶,用冷PBS洗一次。

(7) 加PI避光染色20~30min。

(8) 离心,用PBS重悬细胞,300目尼龙网过滤,上机。

四、样品制备的注意事项

(1) 制成单细胞悬液,不能有粘集、团块,不能有过多的细胞碎片。

(2) 细胞最适密度为$(5\times10^5)\sim(1\times10^6)$个/mL。

(3) 荧光染色后尽量洗净细胞外的多余染料,减少荧光本底。

(4) 双染时尽量选择发射光谱不接近的荧光色素,这样在同一激发光照射下,产生易区别的两种荧光颜色。

(5) 细胞分选后继续培养,样品制备和上机应无菌操作。

第五节 仪器的基本操作步骤

一、FACS Calibur

(一) 基本操作步骤

(1) 先打开仪器电源,再打开计算机。

(2) 检查有没有足够的鞘液(一般4/5满),看鞘液缸有无盖紧以免漏气。

(3) 把压力阀打到"pressure"(压力)位置上。

(4) 运行"cell quest"程序,在"aquire"(获取)窗口里选择"connect to cytometer"(连机)以及"counters"(细胞计数)。

(5) 在"cytometer"窗口选择"detectors"(探测器)、"threshold"(域值)、"compensation"(补偿)、"status"(状态)打开。

(6) 根据需要画出直方图或点图。

(7) 在 aquire 里选择“parameter description”(参数描述),新建一个文件夹存储数据并写 P1、P2、P3、P4、P5。

(8) 上空白样,在 aquire 里选择“aquire”开始获取数据,控制面板选择“run”(运行),流速一般为“low”。同时调节“detectors”的参数使图达到理想状态。

(9) 如果做的样品同时标几种荧光,先测单标样品调节补偿值。

(10) 调好所有的参数,开始上检测管,保存数据。

(11) 检测完毕,从“file”中选择“quit”,退出软件,选择“don't save”至桌面。

(12) 用 4mL 1∶10 稀释的漂白水作样品,将样品置于旁位(vacuum is on),当外管吸去约 2mL,将样品架置于中位(vacuum is off),再“high run” 5min(内管吸去 2mL)。

(13) 改用三蒸水 4mL 作样品,同上处理。

(14) 按“prime”3 次。

(15) 此时仪器自动转为“standby”状态,换 2mL 三蒸水。必须在仪器处于“standby”状态下 10min 后再依次关掉计算机、打印机、主机、稳压电源,以延长激光管寿命,并确保应用软件的正常运行。

(16) 填写使用登记表。

(二) 仪器使用注意事项

(1) 先打开仪器电源,再开计算机,否则软件找不到仪器。

(2) 使用前,先检查鞘液是否够用,废液是否已满。

(3) 检测样品时,顺序是先上空白,再上单标,最后检测管,参数一旦调好,基本不能再做变动。每次测量都需要对照组。

(4) 获取数据时,一般使用低流速,除非细胞太少。

(5) 如果样品中有粘集、团块,不能直接检测以免堵塞进样孔。

(6) 发现吸不上细胞,先检查参数设置是否正确,再检查流式管是否漏气。如果二者皆排除,可能是管道有些堵,应立即清洗。

(7) 检测完毕,一定要先用漂白水再用蒸馏水清洗内外管道。

(三) 仪器维护与保养

(1) 每次测完一定要清洗内外通道。

(2) 不能频繁开关仪器,以免缩短激光器的寿命。

(3) 每个月维护一次管道,用漂白水和蒸馏水代替鞘液清洗。

(4) 定期更换过滤器,提高滤掉大颗粒杂质的效果。

二、FAcs Aria

(一) 基本操作步骤

(1) 打开计算机,打开流动室的门,阻止激光照射。

(2) 打开仪器电源和激光，让激光预热 30min。

(3) 启动“BD FacsDiva”软件，输入密码。

(4) 确定仪器的液流状态，补充鞘液，倒空废液。

(5) 启动液流“instrument”→“fluidics startup”。

(6) 在“breakoff”窗口启动液流柱。

(7) 从“sort”→“sort setup”选定一个需要的模式。

(8) 调节“amplitude”，看液滴好坏。

(9) 液流稳定时，打开“sweet spot”。

(10) 装上需要的收集装置，检查所有液流的位置保证能收集到分选的细胞。

(11) 上样，调节各个参数使条件达到最佳。

(12) 用“accudrop”小球调节“drop delay”。

(13) 运行分选样品，画门来清楚定义想分选的细胞。

(14) 为样品管定义一个“sort layout”。

(15) 上样加压，打开偏转板，点击 sort 开始分选。

(16) 分选结束后先关掉“stream”，然后选择“fluidics shutdown”关掉系统的液流。

(17) 先用 rinse 再用 DI 清洗进样口。

(18) 依次关掉激光器、主机和计算机。

(19) 详细登记使用时间和样品数。

(二) 注意事项

(1) 没有启动液流的时候不可以打开激光，刚开机的时候要打开液流室的门。

(2) 开机之前一定要先检查五个容器的状态，确定主要鞘液是否已空，废液是否已满等。

(3) 用酒精或漂白水清洗时一定要拔掉滤器，以避免对滤膜的损伤。

(4) 由于喷嘴易损坏，上样检测的如果是粘稠样品，一定要尽量稀释到看不到任何团块和沉淀，以免堵塞喷嘴。

(5) 调节参数后液流若还是一直不稳，可能喷嘴没放置好，须取下重新放置。

(6) 分选结束后不能直接退出软件，必须先关掉液流系统，清洗后才可以退出。

第六节　重要参数及意义

一、前向散射光(FSC)

当一个细胞被激光照射后，产生散射光。激光 0°方向上有较强的衍射光，即前向散射光，如见图 18-7 所示。当用遮光板除去本底光的影响时，前向散射光强度是

d/λ 的函数。λ 表示波长，d 表示细胞大小。所以 FSC 反映细胞的大小。

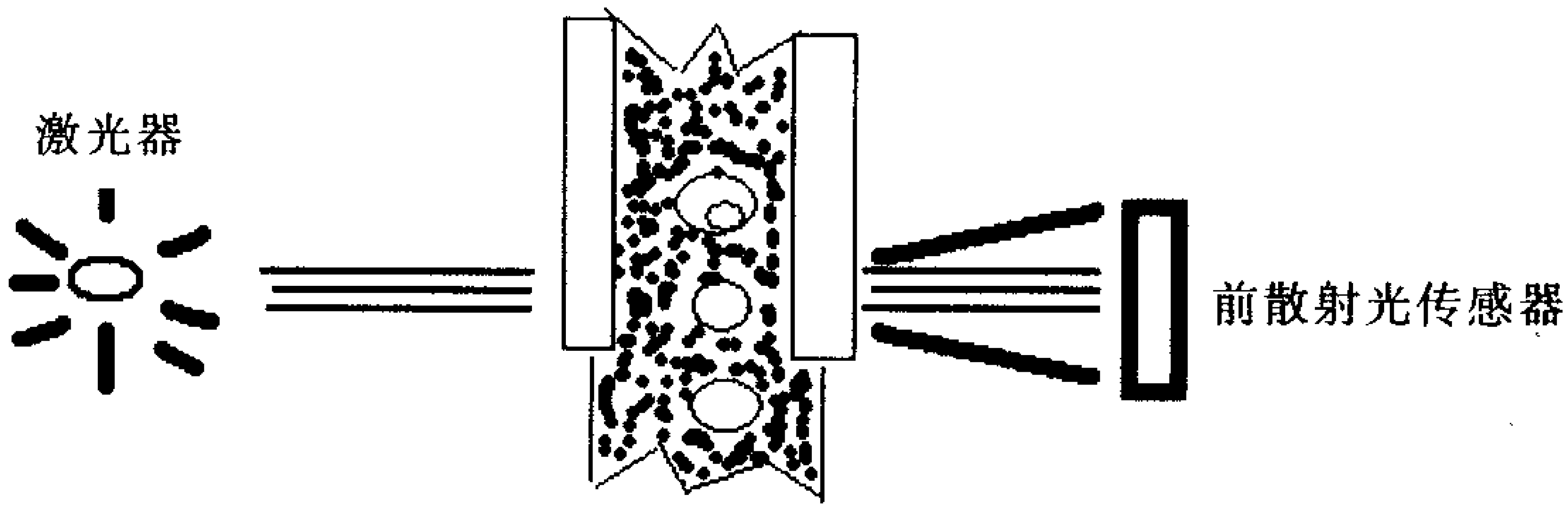


图 18-7 前向散射光示意图

二、侧向散射光(SSC)

也称 90°散射。激光 0°方向上衍射光明显减弱，而反射、折射光很强。这反映细胞内颗粒物质的大小和多少，如图 18-8 所示。

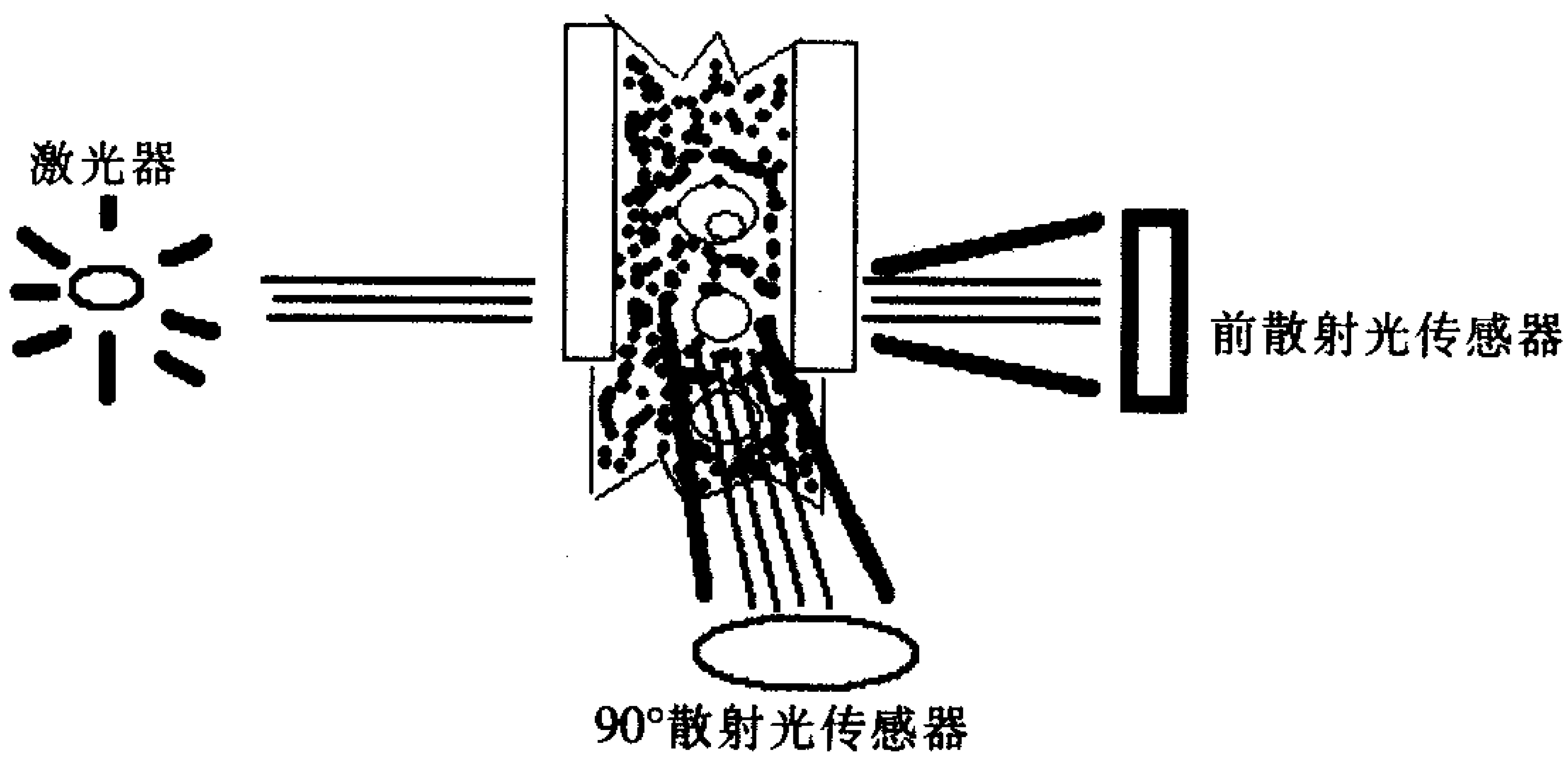


图 18-8 90°侧向散射光示意图

三、荧光信号

细胞经荧光染色后，荧光素受到激发光激发而发射荧光。由于荧光色素的不同，激发后可显示不同的荧光颜色。不同的颗粒结合荧光色素量不同，发射出的荧光的强度、分布亦不同。荧光信号反映生物颗粒表面和内部的各种情况。

荧光信号主要包括两部分：

(1) 自发荧光，即不经荧光染色细胞内部的荧光分子经光照射后所发出的荧光。

(2) 特征荧光，即由细胞经染色结合上的荧光染料受光照而发出的荧光，其荧光强度较弱，波长也与照射激光不同。

自发荧光信号为噪声信号，在多数情况下会干扰对特异荧光信号的分辨和测量。

在免疫细胞化学等测量中，对于结合水平不高的荧光抗体来说，如何提高信噪比是个关键。一般说来，细胞成分中能够产生的自发荧光的分子(如核黄素、细胞色素等)的含量越高，自发荧光越强；培养细胞中死细胞/活细胞比例越高，自发荧光越强；细胞样品中所含亮细胞的比例越高，自发荧光越强。

减少自发荧光干扰、提高信噪比的主要措施是：

(1) 尽量选用较亮的荧光染料；

(2) 选用适宜的激光和滤片光学系统；

(3) 采用电子补偿电路，将自发荧光的本底予以补偿。

四、补偿值

在流式细胞仪上进行多色免疫荧光分析时，使用的不同荧光素的发射光谱有重叠现象，如果不对这种现象做适当的调整，就会导致某一荧光素发出的荧光被其他“错误”的检测器检测到。这种由于补偿问题导致的错误，会得到假阳性的错误结果，并可能在等高图的多色分析时，得到错误的细胞群体。这里通过使用恰当的单染或双染的样本，对补偿加以调整，去除光谱重叠部分的影响信号，就可以准确地在流式细胞仪上进行细胞多色分析了。

补偿不足或补偿设置不当，都会导致假阳性结果或人为造成直方图的偏移。例如，在多色分析中，如果荧光染色细胞的补偿设置不足，就可能在双色等高图上显示出一个假的双阳性群体，导致数据分析失误。在三色荧光分析时，为了防止由于补偿造成的错误，应该使用单染细胞调整补偿，即用每一个荧光抗体单染细胞，然后调整每两种颜色之间的补偿。双色分析时，可以使用两个互斥的单阳性抗体，通过两种单阳性细胞群体和双阴性群体来调整补偿。

具体调整补偿步骤如下：

(1) 检测一个未染色样本(自发荧光)，调整前向角散射光 FSC 和侧向角散射光 SSC 设置，使测定细胞群体显示好，并可以按要求设门。

(2) 设门后，调整自发荧光的 FL1、FL2、FL3 的电压设置(detector settings)，在对数模式下，使自发荧光位于荧光直方图的左侧(10^1 以内)。比较自发荧光和阳性细胞的荧光强度，保证每个荧光的阳性水平都可以按比例显示。

(3) 使用荧光抗体逐个染色(单染)，运行单染样本，调整补偿。检测双色点图，调整补偿设置(compensation settings)，使染色阳性细胞和未染色阴性细胞在横轴水平，在纵轴垂直，如图 18-9 所示。例如，对于 PE 标记的单克隆抗体染色的细胞群，上下调整 FL1-%FL2 的设置，使 FL2 阳性群体与 FL2 阴性群体上下垂直(FL2 vs FL1 点图)；然后，使用 FITC 标记的单克隆抗体染色的细胞群，左右调整 FL2-%FL1 的设置，使 FL1 阳性群体与 FL1 阴性群体左右水平(FL2 vs FL1 点图)。然后，再依次调整第三色补偿 FL2-%FL3 和 FL3-%FL2。

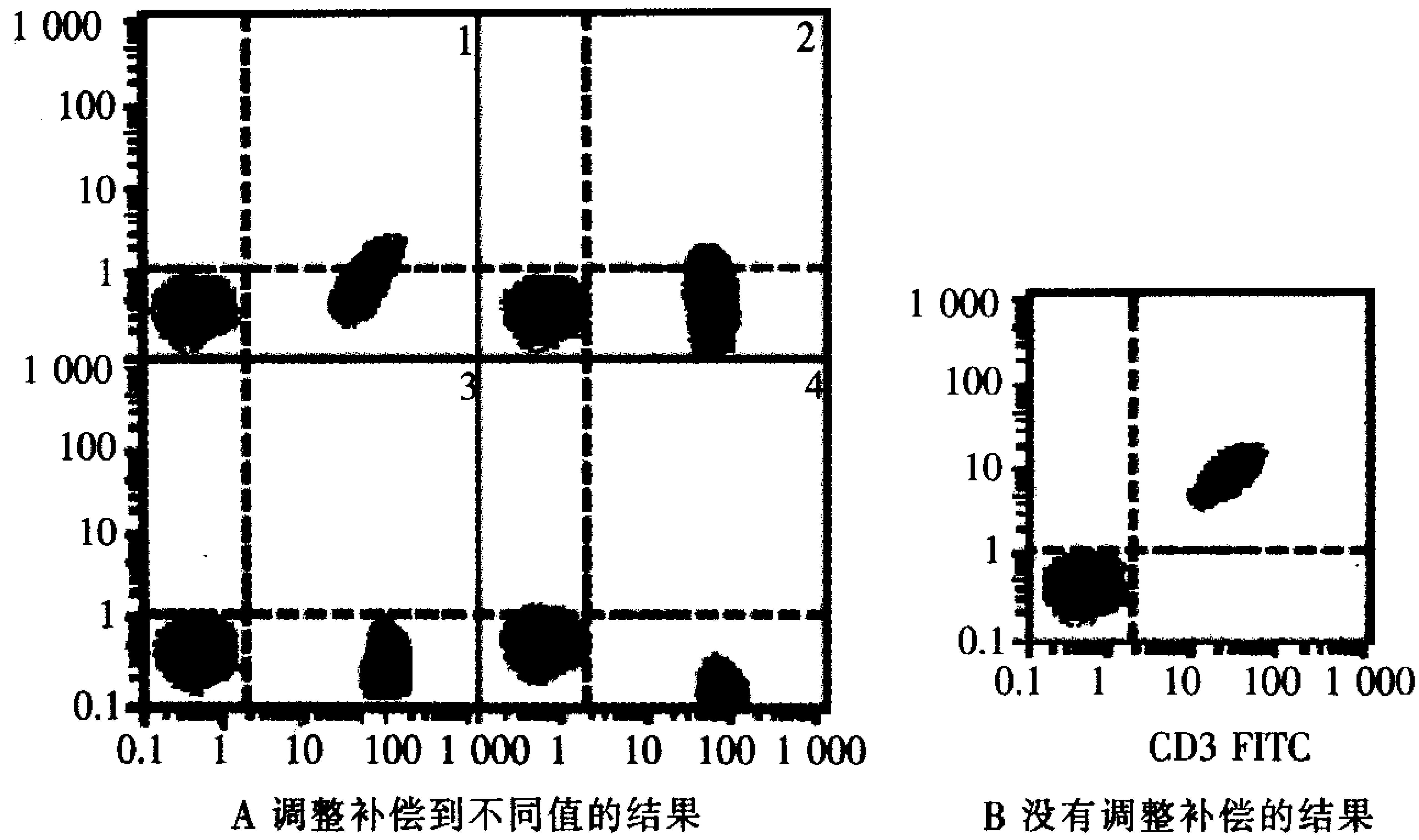


图 18-9 调整补偿的结果

五、使用双色补偿质控样本，微调补偿

例如用 FITC 和 PE 单克隆抗体，PE 和 Cy-Chrome 单克隆抗体染色，最好使用互斥的单克隆抗体和同型对照染单阳性细胞群体。也可以将两种单染细胞混合，用一个样本管进行双色补偿调整（如混合 FITC 和 PE 染色细胞），在缺少互斥标记的情况下，可以使用此方法。每一种细胞群体应位于相应的象限。

第七节 数据处理与分析

一、流式的实验数据主要有以下几种形式

（一）直方图

以细胞数为纵坐标，取 FSC、SSC、FL1、FL2、FL3 的任意一个为横坐标。图上的每个峰表示某些性质相同的一群细胞，如图 18-10 所示。

（二）点图

任选两个参数为 *X*、*Y* 轴，每个点代表一个细胞，可以区分细胞性质不同的群体，如图 18-11 所示。

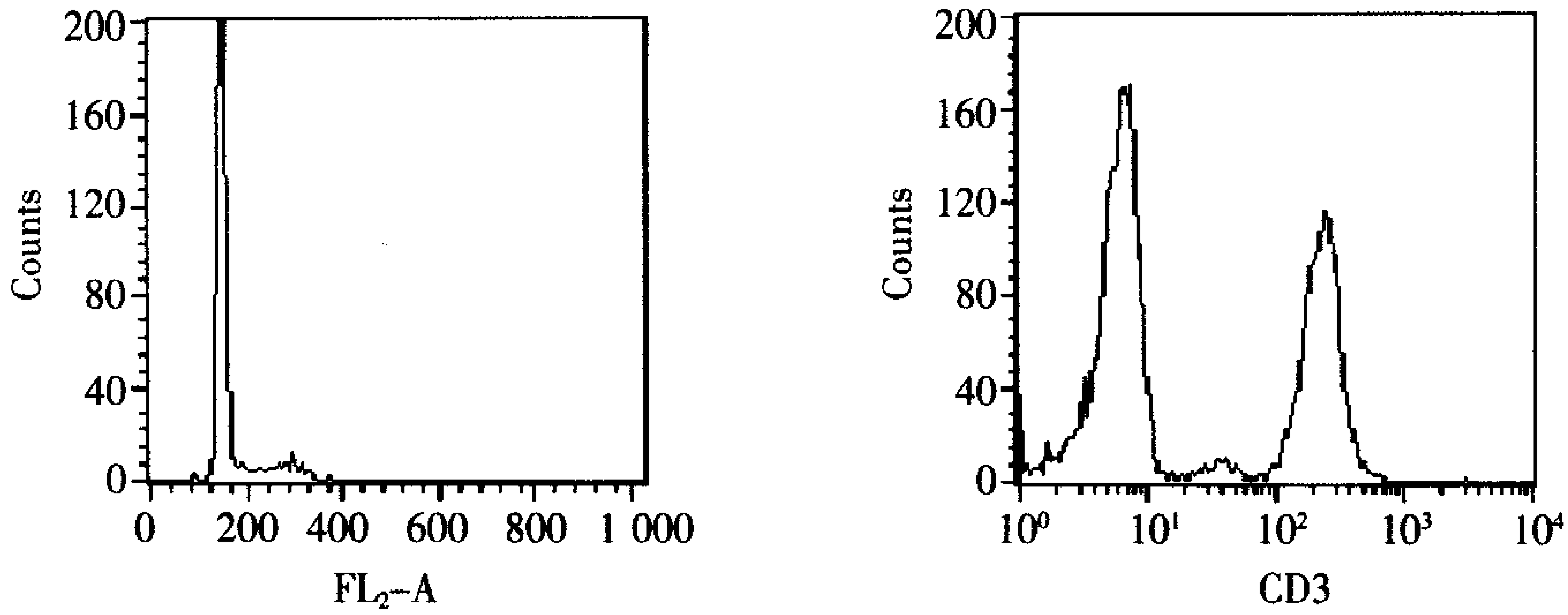


图 18-10　直方图

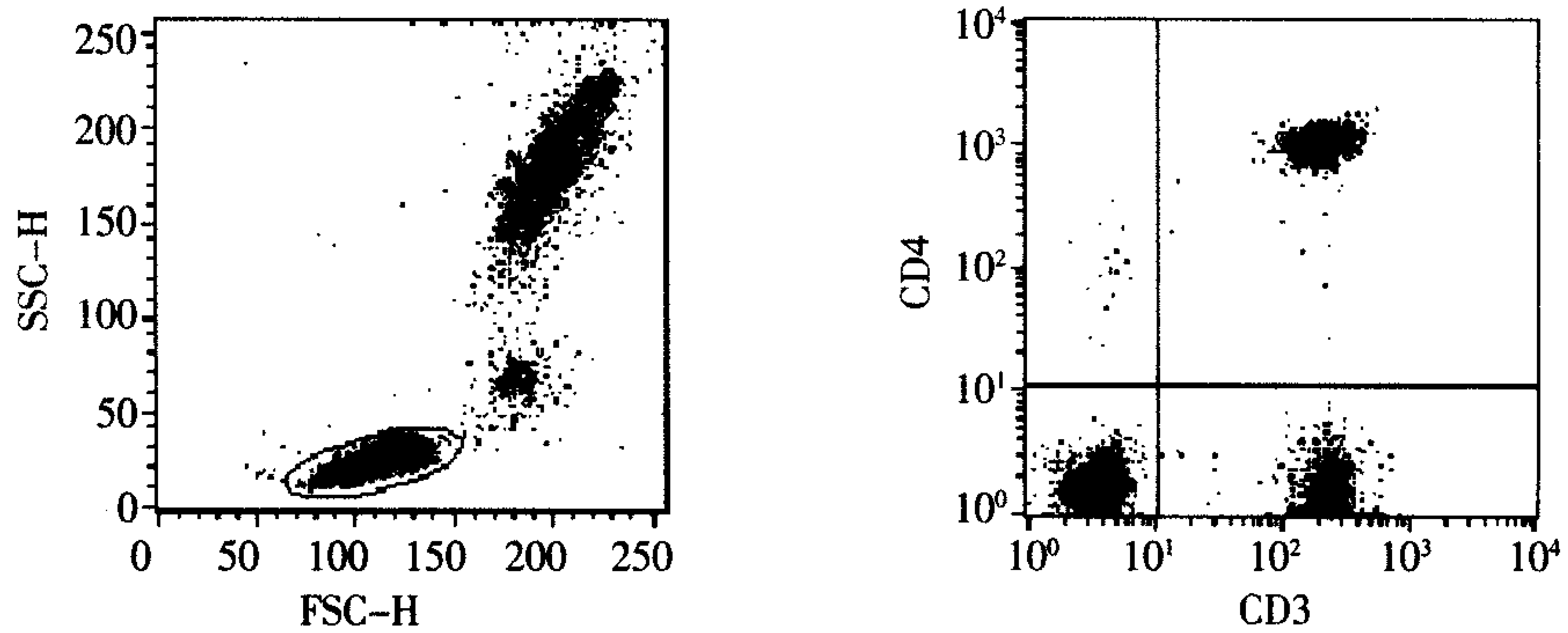


图 18-11　点图

（三）等高图和密度图

图 18-12 所示的等高图是类似于地图上等高线的表示法。它是为了克服二维点图的不足而设置的显示方法。等高图上每一条连续曲线上具有相同的细胞相对或绝对数，即“等高”。曲线层次越高，所代表的细胞数愈多。一般层次所表示的细胞数间

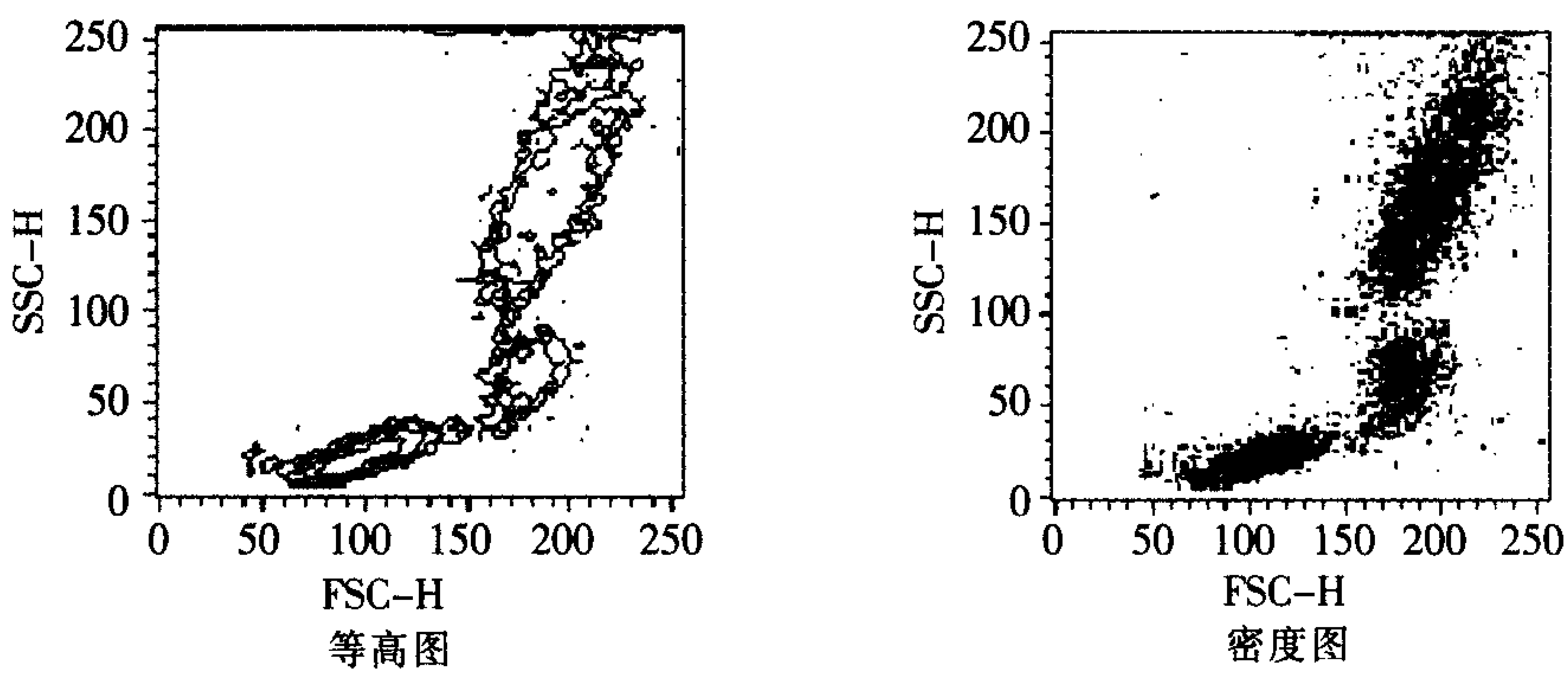


图 18-12　等高图和密度图

隔是相等的,因此等高线越密集则表示变化率越大,等高线越疏则表示变化平缓。

密度图上点密度大小代表细胞密度大小,点越密集表示细胞数越多。

二、数据分析

考虑到FCM的可靠性,要注意到对每组测量都要有对照组。对照组可以是空白对照组、阴性对照组、或零时刻对照组等,具体设置应根据整体实验要求而定。

流式细胞仪的数据获取软件主要为CellQuest,它也可以用于分析数据。专门用于分析数据的软件为WINMOI,用户可以自行通过正规途径获取。此外也常用ModFit软件专门计算细胞周期。

第十九章　荧光定量PCR仪

第一节　概　　述

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction，PCR)，是体外扩增特定DNA片断的新技术。其特点是操作简便，在短时间内就可获得数百万个特异DNA序列的拷贝。

PCR技术从发明到现在仅有20多年时间。最初只是DNA大分子的易折性以及限制性内切酶的被发现，分子生物学家便开始大量使用限制性内切酶和寡核苷酸探针来研究DNA，直到1983年12月16日Cetus公司的Kary Mullis第一次合成核苷酸探针，实验成功，发明了PCR。1985年，关于PCR的文章首次在《科学》上发表。1987年Cetus公司在美国获得PCR基本技术专利批准，成立了Perkin-Elmer Cetus仪器公司(PECI)，同年11月推出了第一个PCR试剂产品及第一台热循环仪。1989年12月《科学》杂志将PCR和它所使用的聚合酶命名为第一个"年度分子"。1990年，Cetus公司的研究人员D. Gelfand和S. Stoffel发明了纯化Taq DNA多聚酶的方法，第一个PCR试剂盒用于HLA定量检测分析。1992年Cetus公司获得Taq酶、热循环扩增仪等专利。1993年Kary Mullis因PCR的发明获得该年度诺贝尔化学奖。

PCR技术在分子生物学中很快就得到了广泛应用，推动了分子生物学及其相关学科的快速发展。但早期的PCR检测有易污染、假阳性率高等缺点。为了克服这些缺点，近年来，又发展了多种将传统PCR技术与其他技术结合的新型PCR技术，最成功的有PCR与ELISA相结合的PCR-ELISA技术和PCR与荧光检测相结合的荧光定量PCR技术。它们不仅克服了早期PCR的缺点，而且还具有操作简单，结果直观、可靠、重复性好、特异性强、定量准确等优点。其中荧光定量PCR技术通过与计算机连接，可分析PCR过程中产生的荧光信号，实现了实时、在线检测PCR的扩增过程，而无需对PCR扩增产物进行后处理，成为分子生物学研究及医学临床检测中的一个越来越重要的检测手段。

第二节 基本原理

所谓实时荧光定量 PCR 技术，是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

一、荧光定量化学原理

实时荧光定量 PCR 常用的检测模式有 TaqMan/TaqMan MGB 探针法和 SYBR Green I 荧光染料法两种。

(一) TaqMan/TaqMan MGB 探针法

TaqMan 技术的要点是，在普通 PCR 原有的一对特异性引物的基础上增加了一条特异性的荧光双标记探针。该探针同样与核酸特异性结合，而且结合部位位于引物结合区域的中间。探针的 5′端和 3′端分别标记不同的荧光素，如 5′端标记 FAM 荧光素，它发出的荧光能够被检测仪器接收，称为报告荧光基团；3′端一般标记 TAMRA 荧光素，它在近距离内能吸收 5′端报告荧光基团发出的荧光信号，称为淬灭荧光基团。当 PCR 反应在退火阶段时，一对引物和一条探针同时与目的基因片段结合，探针位于引物之间。此时探针 5′端的报告荧光基团发出的荧光信号被 3′端的淬灭荧光基团吸收，仪器检测不到荧光信号。当 PCR 反应进行到延伸阶段时，Taq 酶在引物的引导下，以四种核苷酸为底物，根据碱基配对的原则，沿着模板链合成新链。当链的延伸进行到探针结合部位时，受到探针的阻碍而无法继续，此时的 Taq 酶发挥它的 5′→3′外切核酸酶的功能，将探针切成单核苷酸，消除阻碍，将链延伸过程进行到底，合成新链。而被水解的探针，其 5′端和 3′端的荧光素此时都游离于溶液中，5′端荧光素发出的荧光信号不再被 3′端的淬灭基团吸收，荧光信号即被仪器接收。PCR 进行一个循环，合成了多少条新链就水解了多少条探针，释放了相应数目的荧光基团，荧光信号的强度与 PCR 反应产物的量呈对应关系。随着 PCR 过程的进行，重复上述过程，PCR 产物呈指数形式增长，荧光信号也相应增长。整个过程如图 19-1 所示。

与上述 TaqMan 探针相比，TaqMan MGB 探针有两个主要的不同：一是探针 3′端标记了自身不发光的淬灭荧光分子，以取代常规可发光的 TAMRA 荧光标记。这使荧光本底降低，荧光光谱分辨率得以大大改善。二是探针 3′端另结合了 MGB (minor groove binder)结合物，大大增加了探针的杂交稳定性，使结果更精确、分辨率更高。

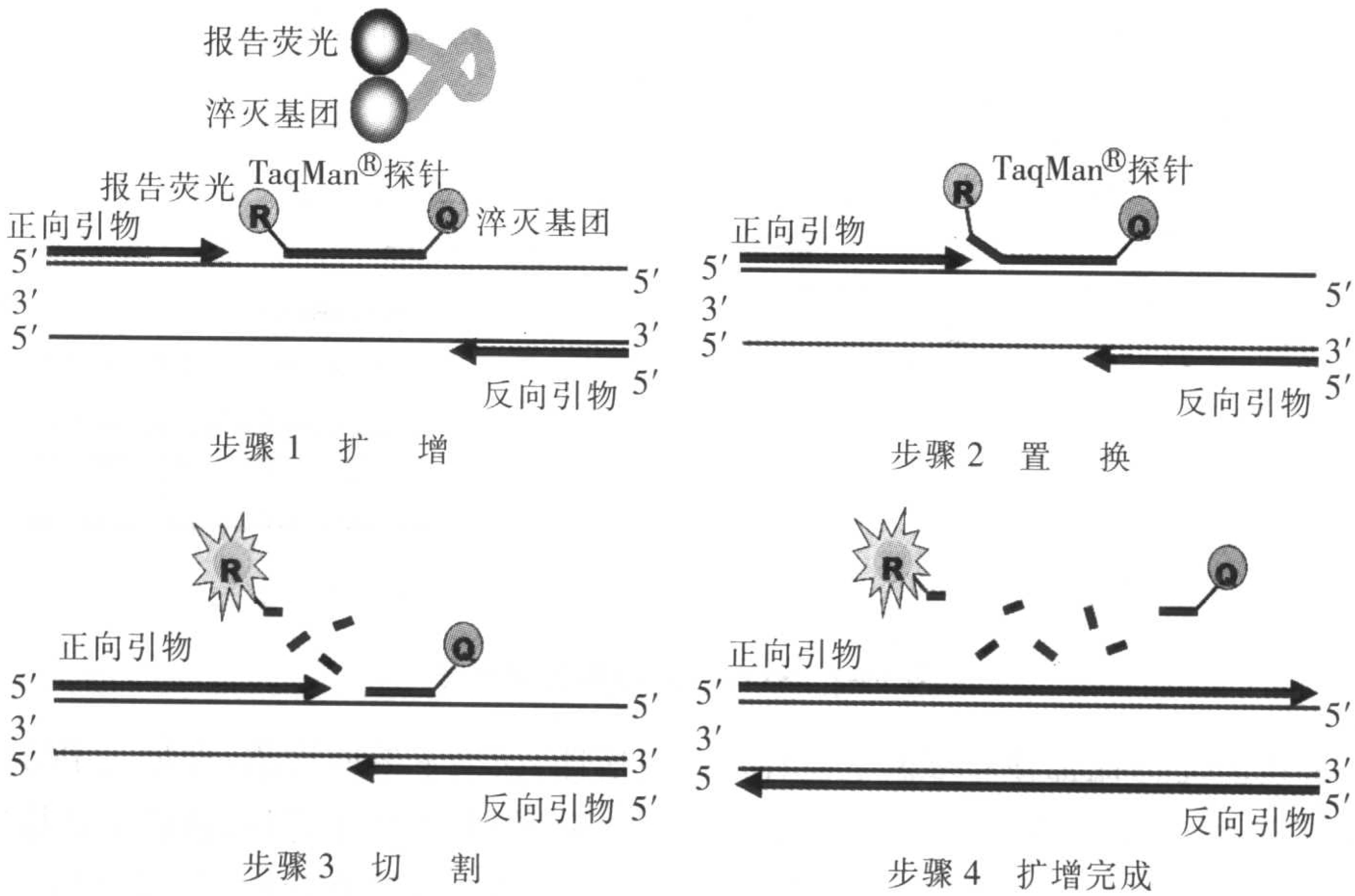


图 19-1　TaqMan 探针法

探针设计一般应符合以下条件：GC 碱基含量在 40%～60%；避免单核苷酸序列的连续重复，尤其是 G；避免 5′端为 G，因为 G 对荧光可能有抑制作用，尽量使 C 的个数多于 G；长度应在 15～25 个碱基左右，以保证结合的特异性；探针的 *T*m 值要比引物的 *T*m 值至少高出约 10℃。另外，探针与引物不能形成二聚体，位置与上游引物尽量接近但不要重叠。

（二）SYBR Green I 荧光染料法

SYBR Green I 是一种只与双链 DNA 小沟结合的染料，当它与 DNA 双链结合时，发出荧光；不掺入链中的 SYBR 染料分子不会发射任何荧光信号，当它从 DNA 双链上释放出来时，荧光信号急剧减弱，从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。因此，在一个体系内，其信号强度代表了双链 DNA 分子的数量，如图 19-2 所示。它的缺点在于能与非特异性双链 DNA（如引物二聚体）结合，但其产生的干扰可通过熔解曲线分析得到解决。

上述两种定量方法是目前应用比较多的，两者各有所长：TaqMan /TaqMan MGB 基于引物和探针的高度特异性；而 SYBR Green 则基于引物的特异性，同时较 TaqMan 便宜，用于对特异性要求不高的场合。

（三）UNG 酶和金牌 Taq 酶原理

为保证定量的准确性，需预防非特异性 PCR 扩增和污染。常用的措施为使用 UNG 酶（Uracil-N-Glycosylase）和热启动。UNG 酶的作用原理是降解含有 dU 的双链或单链 DNA。它在 50℃激活，95℃灭活。由于商用 PCR 试剂盒均以 dUTP 取代 dTTP，所以 PCR 产物都是含有 dU 的 DNA 链。在定量 PCR 开始前增加 50℃的

保温步骤,UNG 酶即可将已有的 PCR 产物降解破坏,防止可能造成的污染。

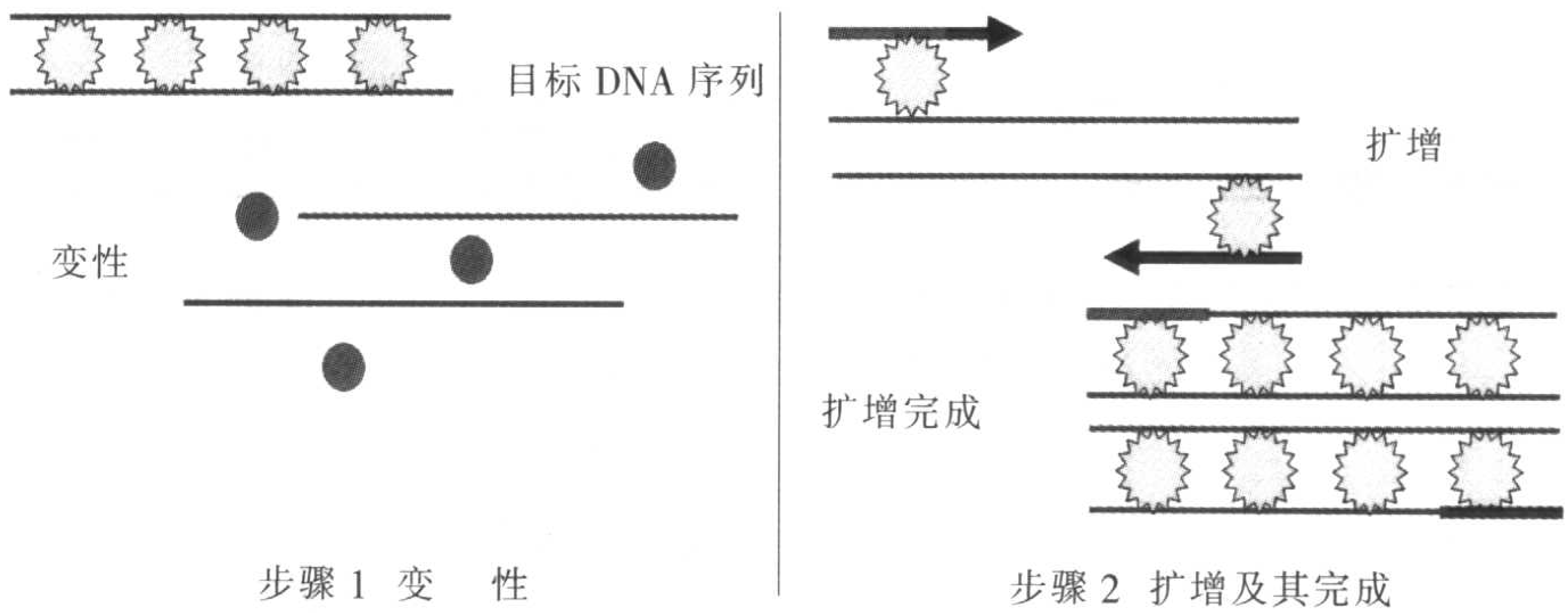


图 19-2 SYBR Green 荧光染料法

普通的 Taq 酶即使在室温下也有一定的活性,如果不采取措施,在加入 PCR 试剂的过程中、正式 PCR 开始前就会完成少量 PCR 扩增,增加了背景,影响定量精度。而金牌 Taq 酶经过特殊修饰,常温下其活性部位被封闭,没有活性;只有经过 95℃ 10min 的热启动以后,封闭被解除,才能开始 DNA 链延伸,这样就最大限度地减少了杂信号的生成。

二、荧光定量 PCR 仪的光学原理

目前在国内使用得比较多的荧光实时定量 PCR 仪有美国应用生物系统公司(Applied Biosystems,ABI)的 7000、5700、7900、7700 型和 Roche 公司的 LightCycler 等。现以 ABI Prism 7000 型 PCR 仪为例,简单介绍 PCR 仪的光学原理。

图 19-3 显示了 PCR 仪整个定量过程:光源灯发出激发光,通过滤镜等光学组块到达 96 孔板上;样品中发射的荧光按照原路返回,在双色镜处,由于波长与入射光不

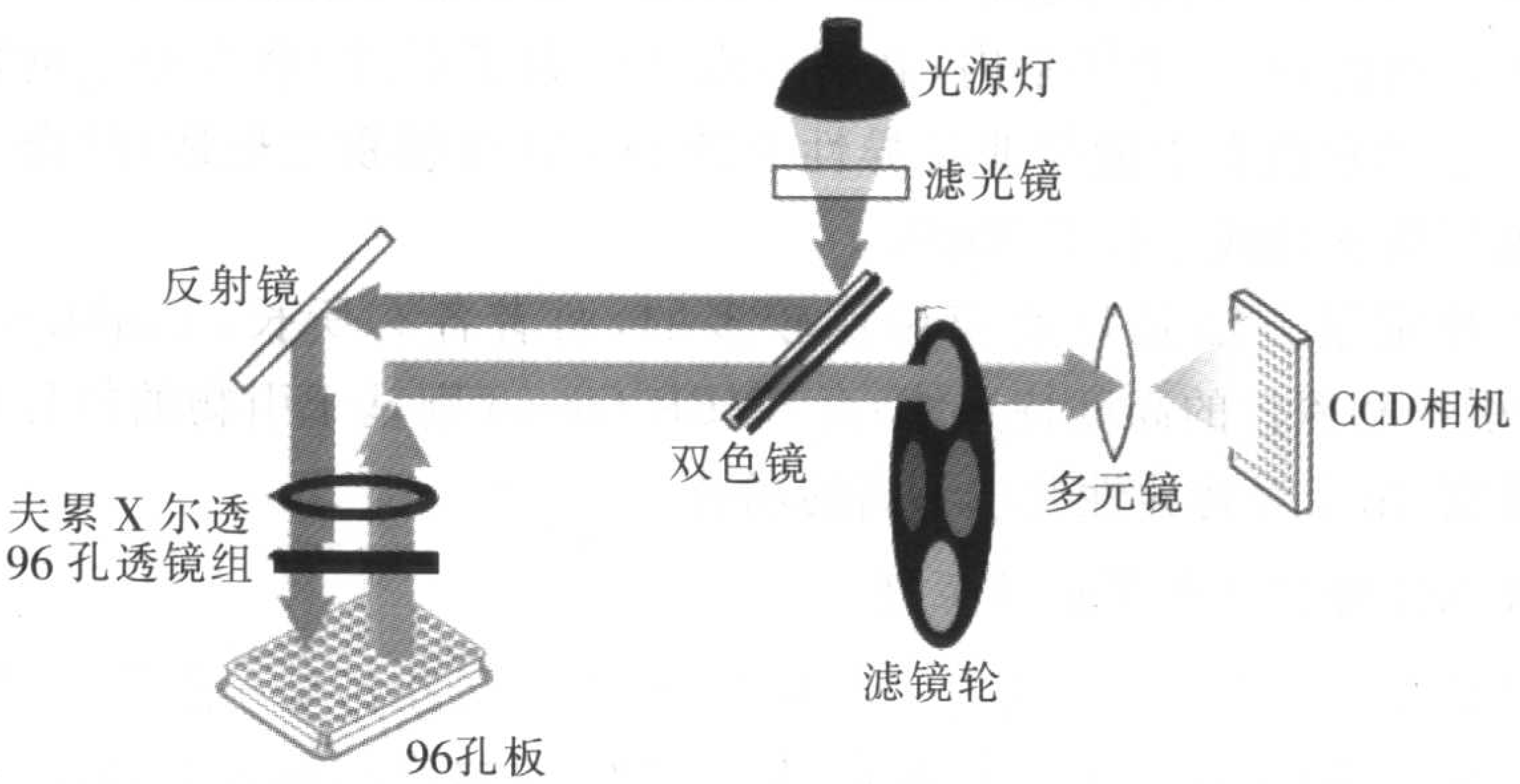


图 19-3 PCR 仪的光学原理图

同，因此可以透过该镜到达滤镜轮；滤镜轮是可以旋转选择不同滤镜的一个部件，它可以使特定波长的光通过，从而达到区分产物的目的；通过滤镜轮的荧光经过多元镜后被仪器自带的 CCD 相机所捕捉到，从而产生一个荧光信号，输入计算机进行计算分析。

三、荧光定量原理

在荧光定量 PCR 技术中，有一个很重要的概念—— Ct 值。C 代表 Cycle，t 代表 threshold，Ct 值的含义是：每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数，如图 19-4 所示。

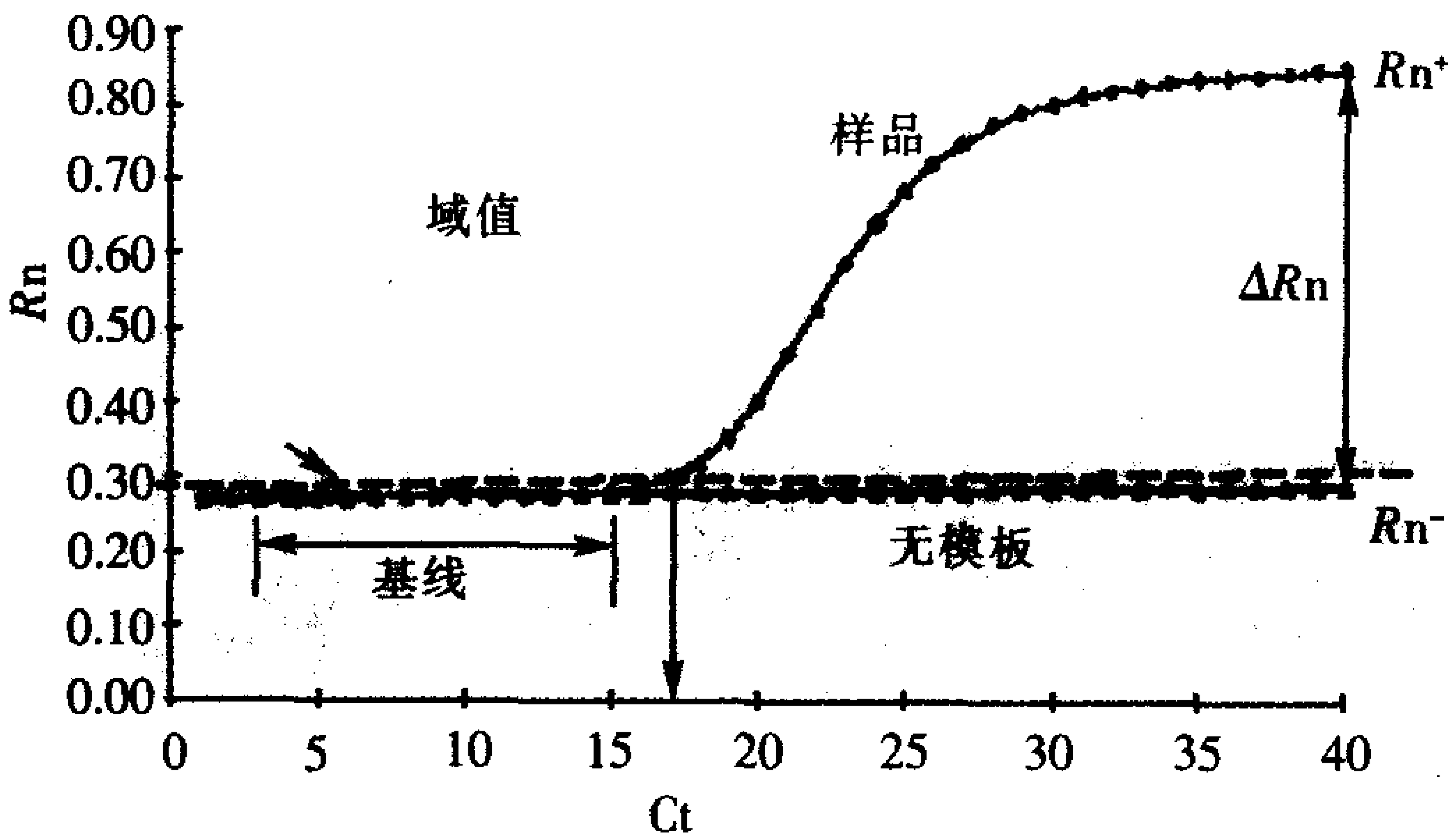


图 19-4　Ct 值的确定

荧光域值(threshold)的设定以 PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号，荧光域值的缺省设置是 3～15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍，即：

$$threshold = 10 \times Sdcycle_{3\sim15}$$

Ct 值与起始模板的关系研究表明，每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系，起始拷贝数越多，Ct 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线，其中横坐标代表起始拷贝数的对数，纵坐标代表 Ct 值，如图 19-5 所示。因此，只要获得未知样品的 Ct 值，即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。

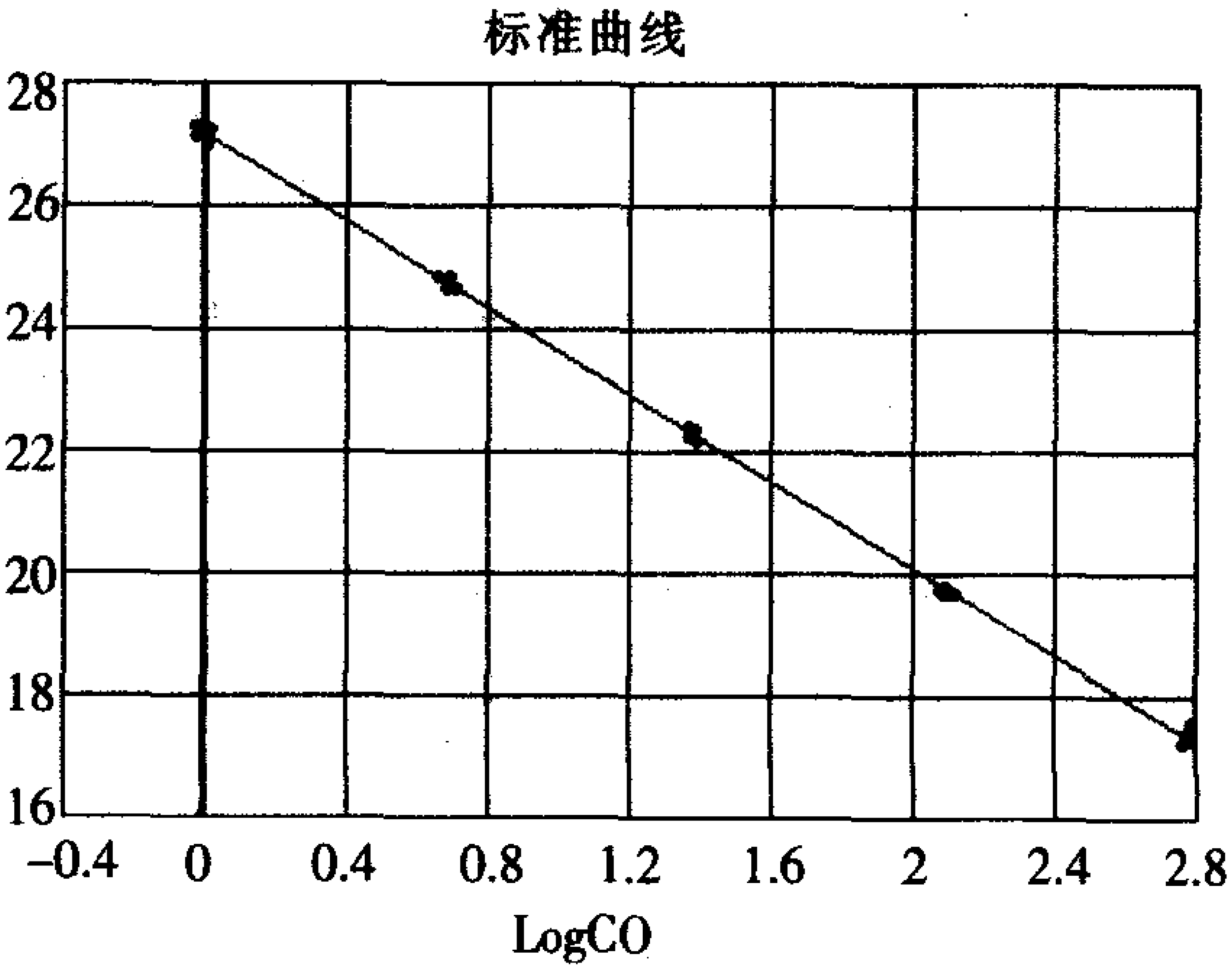


图 19-5　荧光定量标准曲线

第三节 仪器简介

7000 型荧光定量 PCR 仪面向低通量至中等通量的用户，可满足临床检验、医学研究和基础实验的要求，如图 19-6 所示。随机配置的定量 PCR 引物和探针设计软件 Primer Express 非常有用，因为到目前为止还没有其他软件有能力设计定量 PCR 所需的 TaqMan 探针。

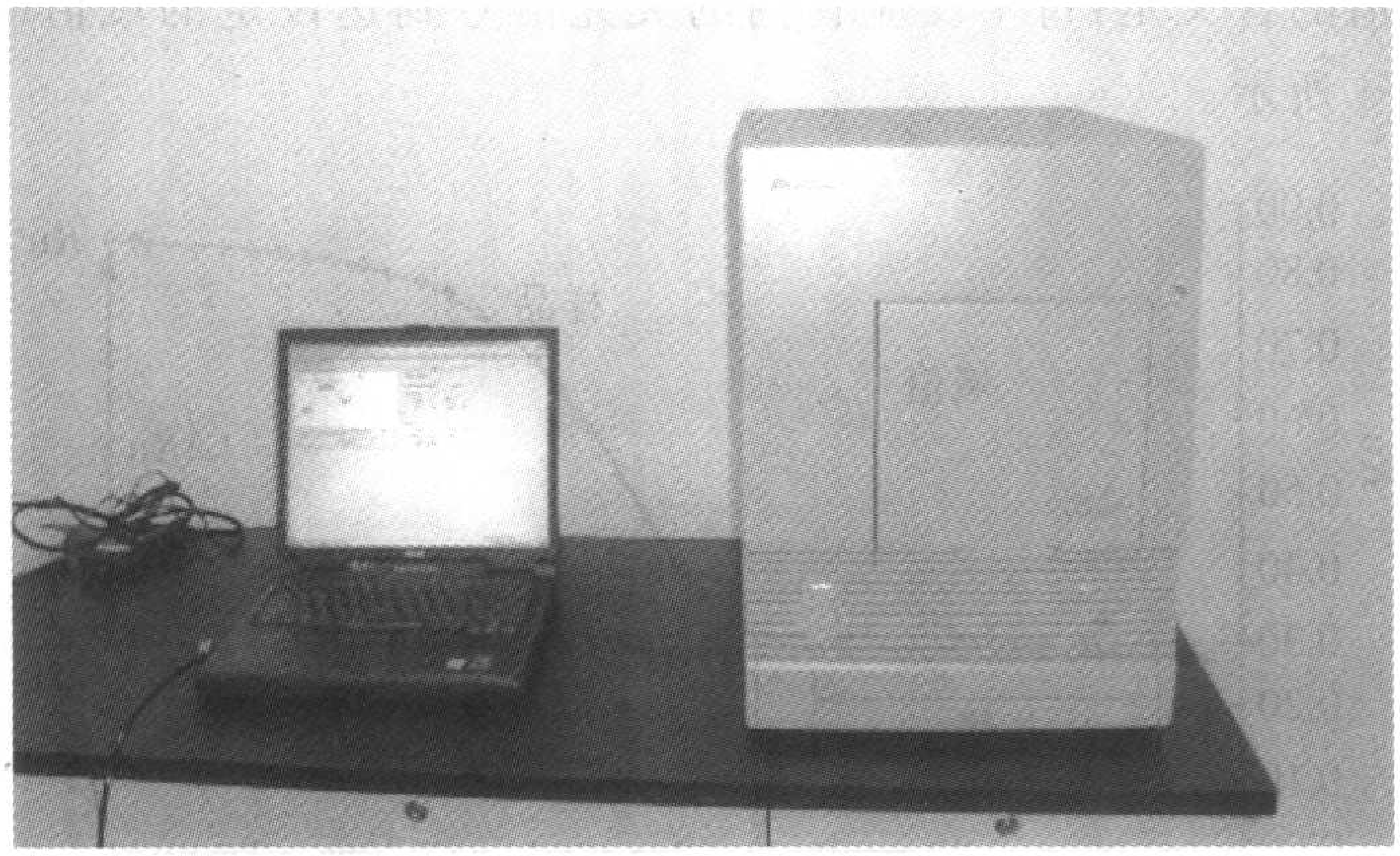


图 19-6 ABI Prism 7000 型荧光定量 PCR 仪

7000 型荧光定量 PCR 仪有实时动态(Real-Time)和终点读板(Plate Read)两种运行模式。实时动态模式用于定量，测定 DNA 或 RNA 拷贝数。7000 型荧光定量 PCR 仪可以动态显示 PCR 扩增曲线的生成，定量的线性范围大于 7 个数量级，区分 5 000～10 000 个拷贝的 DNA 模板可信度达 99.7%。终点读板模式用于基因型鉴定、点突变检测和单核苷酸多态性(SNP)分析等。当然，7000 型荧光定量 PCR 仪也可以作为普通 PCR 仪使用。ABI 已经发布 12 万个商品化的定量 PCR 试剂盒，覆盖人类全部 4 万个基因，平均每个基因 3 个检测试剂盒，为运用 7000、7700、7900 型荧光定量 PCR 仪开展课题研究创造了绝佳的条件。

7000 型荧光定量 PCR 仪最大特色是具备多色检测能力，荧光检测的波长范围为 530～590nm，能够有效地分辨 FAMTM / SYBR Green I、VICTM / JOETM、TAMRATM、ROXTM 等荧光染料。多色荧光检测技术为多重定量、SNP 分析、基因型分型和带阳性内对照的阴/阳性分析提供了基础。多重定量即在同一反应管内同时对多个目标基因进行定量，可以大大提高精度并节约成本。

7000 型荧光定量 PCR 仪支持两种定量化学：TaqMan 荧光探针和 SYBR Green I 荧光染料。其熔解曲线(dissociation curve)功能用于判断 PCR 扩增反应是否特异，有无杂带生成。

目前，7000 型荧光定量 PCR 主要有以下几个方面的应用：

1. 定量检测

绝对定量：基因表达研究、转基因食品检测、病原体检测。

相对定量：基因在不同组织中的表达差异、药物疗效考核。

核酸实时定量的过程与结果如下：首先，20K、10K、5K、2.5K 和 1K 扩增曲线（每组重复 4 次），如图 19-7 所示；

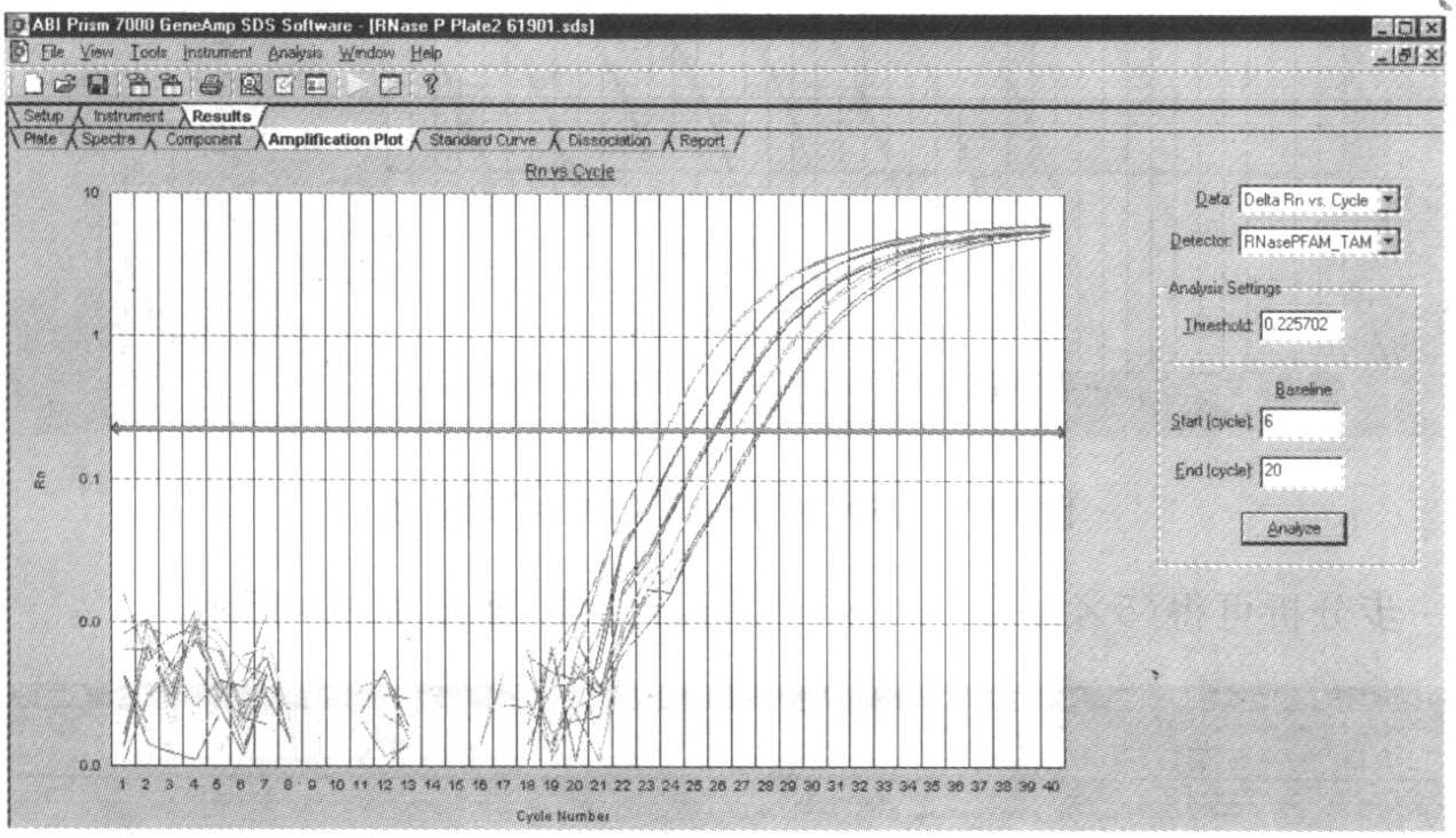


图 19-7　20K、10K、5K、2.5K 和 1K 扩增曲线

然后，"未知样品"10K 和 5K 扩增曲线（每组重复 36 次），如图 19-8 所示；

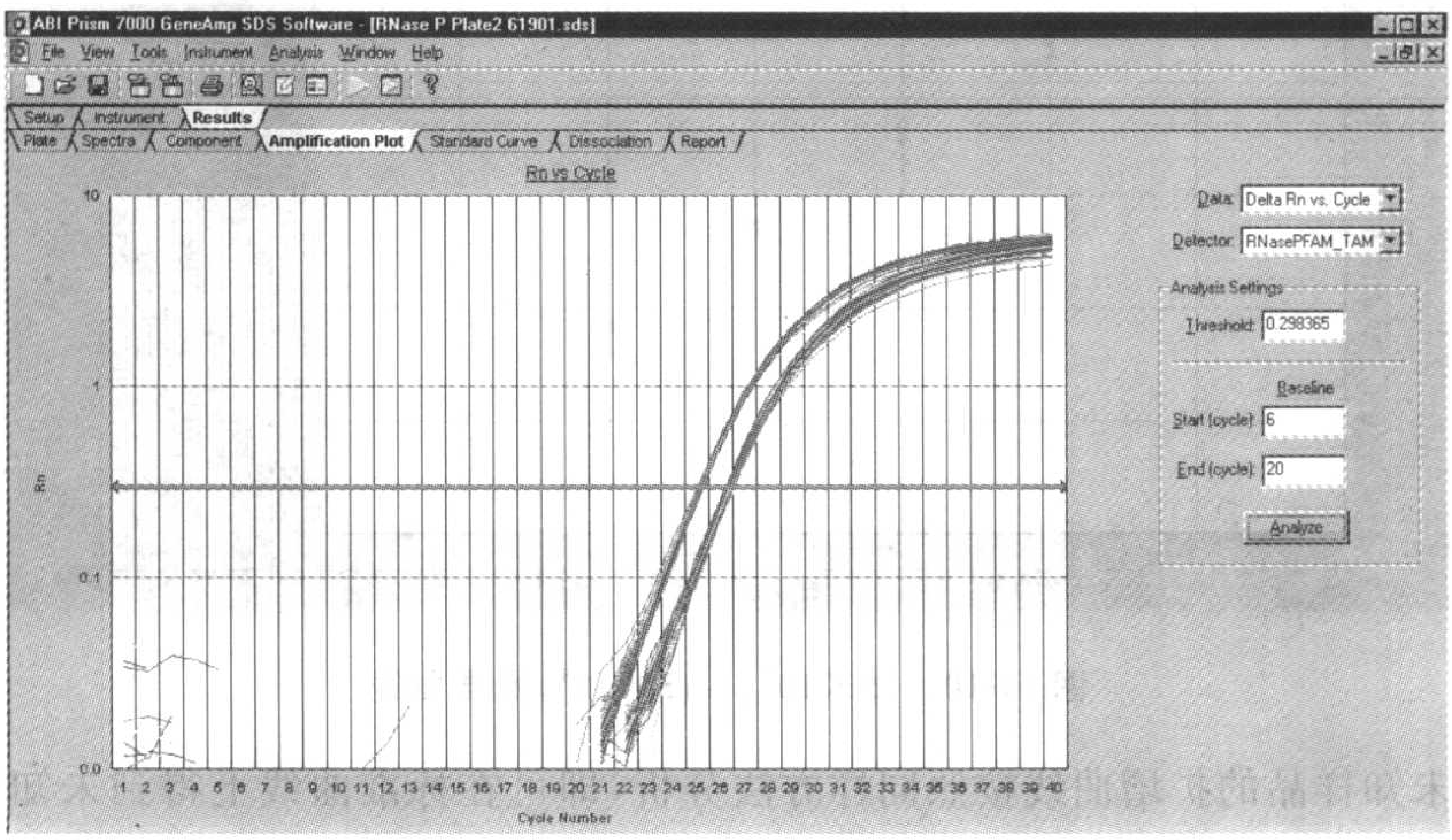


图 19-8　未知样品 10K 和 5K 扩增曲线

经过软件分析可以得到$(5\times10^1)\sim(5\times10^8)$扩增曲线，如图 19-9 所示；

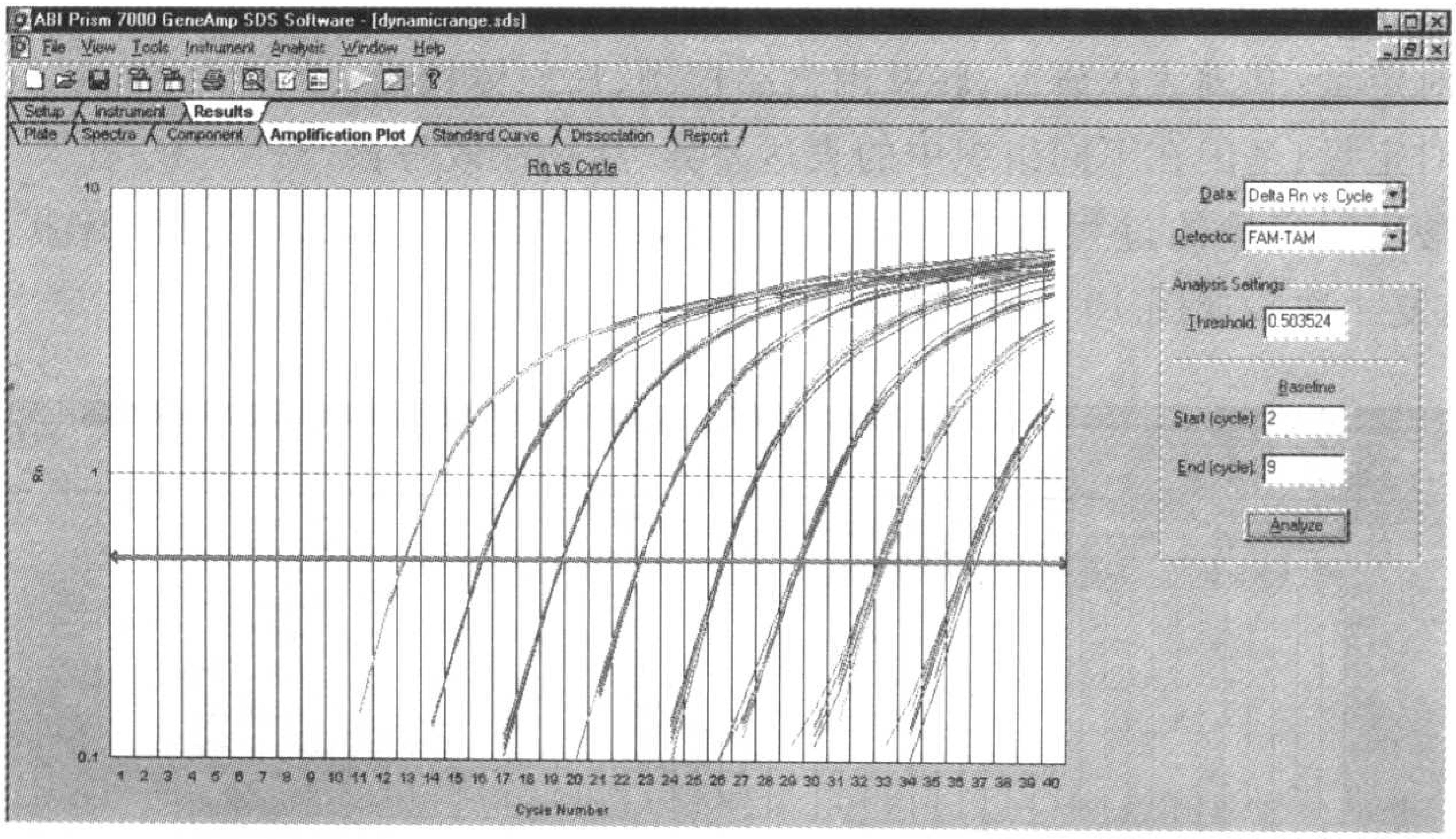


图 19-9 $(5\times10^1)\sim(5\times10^8)$扩增曲线

进一步分析可得$(5\times10^1)\sim(5\times10^8)$标准曲线，如图 19-10 所示。

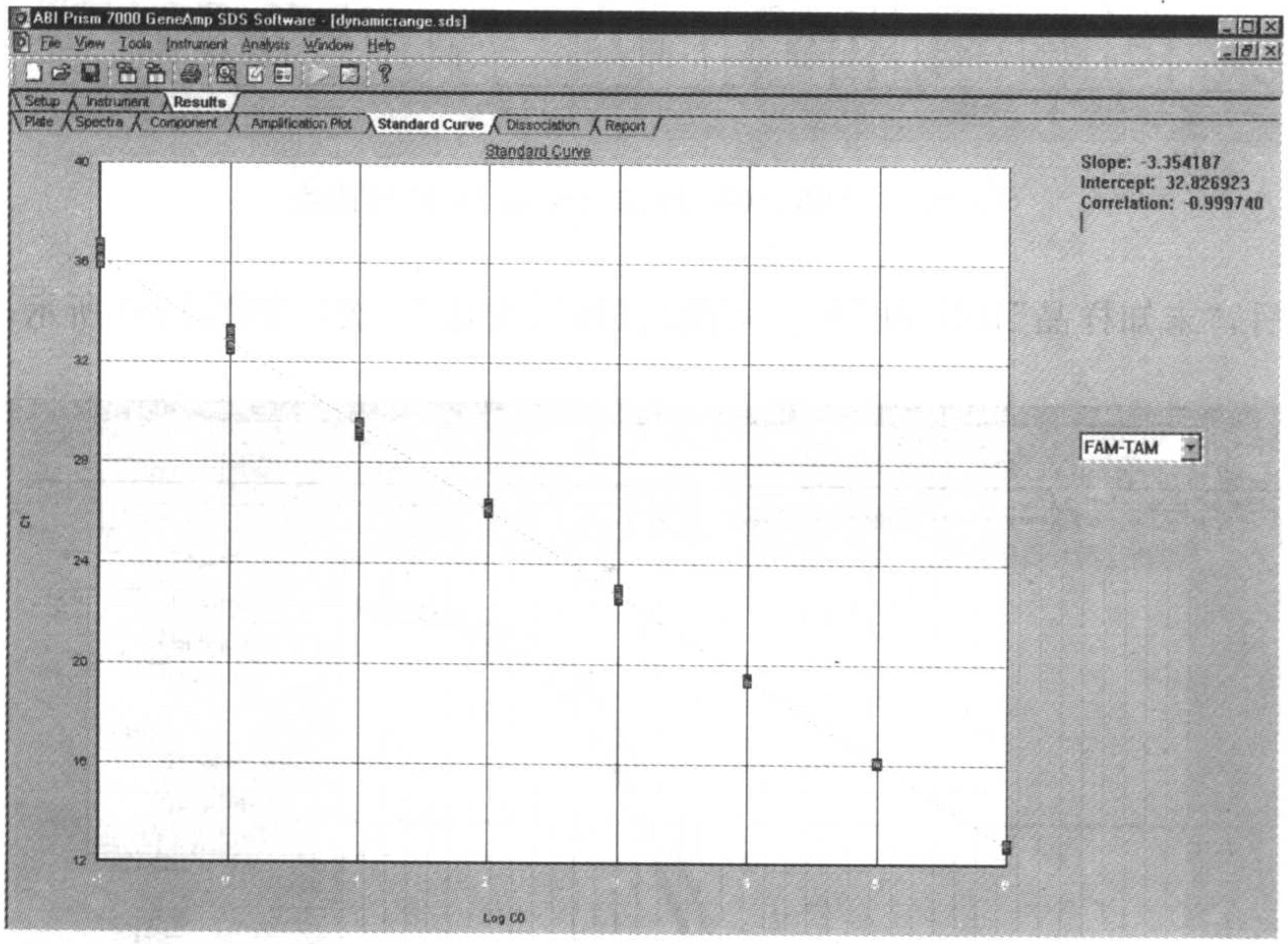


图 19-10 $(5\times10^1)\sim(5\times10^8)$标准曲线

将未知样品的扩增曲线按照同样方法分析，即可在标准曲线上得到未知样品的含量。

2. 点突变检测

检测与疾病相关的等位基因点突变，SNP 检测。

实时荧光定量 PCR 的一个诱人的应用前景是，用于检测基因突变和基因组的不

稳定性。基因突变的检测基于两条探针，一条探针横跨突变位点，另一条为锚定探针，与无突变位点的靶序列杂交。两条探针用两种不同的发光基团标记。如靶序列中无突变，探针杂交便完全配对；如有突变，则探针与靶序列不完全配对，会降低杂交体的稳定性，从而降低其熔解温度。这样便可对突变和多态性进行分析。

美国的 Ibrahim 等应用实时荧光定量 PCR 技术对正常的痘病毒多态性进行了研究。他们根据正常痘病毒血凝素基因的某一 DNA 片段设计了上、下游引物，并设计了两个寡核苷酸探针(它们仅在某一核苷酸存在差异)，对探针进行荧光标记后用于实时定量 PCR 检测，结果成功地鉴定了存在此单核苷酸差异的两个痘病毒株。

第四节　样品制备及操作步骤

常见的样品制备及操作如下：

一、DNA 用量

DNA 用量：10～100ng 每反应；

cDNA 用量：1～100ng RNA 反转录所得 cDNA 取 1μL。

引物和探针浓度：

引物	终浓度	
Probe	50～250nM	约 5pmol/Rxn
Forward Primer	50～900nM	约 22.5pmol/Rxn
Reverse Primer	50～900nM	

注：反应体积：5～50μL

二、TaqMan 探针法 PCR

试剂	用量 (μL)
cDNA (1～100ng RNA 反转录所得 cDNA)	1
2 × TaqMan Universal PCR Master mix	10
20 × Gene Expression kit (Probe/Primer mix)	1
H_2O	8

注：总体积 20μL

PCR 循环参数：50℃ 2min → 95℃ 10min → (92℃ 15s → 60℃ 1min) × 40 个循环。

三、SYBR Green I荧光染料法 PCR

试剂	用量（μL）
cDNA（1～100ng RNA 反转录所得 cDNA）	1
2 × SYBR Green PCR Master mix	12.5
Forward Primer（22.5pmol/Rxn）	900nM
Reverse Primer（22.5pmol/Rxn）	900nM
H_2O	25

注：总体积 25μL

PCR 循环参数：50℃ 2min → 95℃ 10min →（92℃ 15s → 60℃ 1min）× 40 个循环。

四、ABI Prism7000 SDS v1.0 软件操作

检查计算机与仪器的联线是否正常，打开计算机后，打开 ABI Prism 7000 主机电源，然后启动 SDS 应用软件。

1. 新建文件

菜单 File → New，Assay 选择 Absolute Quantification（实时定量模式），打开一个空白文件。

2. 探针设置

双击任意一个孔，打开 Well Inspector 窗口。该窗口也可以从菜单 View → Well Inspector 打开。在 Detector Manager 窗口，从探针列表中点击选择所需探针，按住 Ctrl 键可以选择多个探针，再点击 Add to Plate Document 按钮。最后点击 Done 关闭 Detector Manager 窗口。

3. 填样品表

在 96 孔表中选定有样品的一个或多个孔，在 Well Inspector 页面的 Sample Name 栏中填入样品名称；在探针列表的 Use 项下的方框中，选定要用的一个或多个探针；在 Task 栏中选择指定样品类别：阴性对照选 NTC，未知样品选 Unknown，标准品选 Standard。对于 Standard，还要在 Quantity 栏中输入 DNA 拷贝数。注意：只有在这里输入拷贝数后，软件才能自动生成标准曲线。建议标准品的梯度浓度在 5 个以上，每个样品（包括标准品）都按照统计学要求作一定数量的重复管。

4. 参比荧光

如果使用的是 ABI 公司的定量 PCR 试剂，如 TaqMan Universal PCR Master Mix 或者 SYBR Green PCR Master Mix 等，参比荧光（Passive Reference）选 Rox；如果使用的试剂中不含有参比荧光，请选 None。完成后点击右上角的×按钮，关闭 Well Inspector 窗口。

5. 循环参数

切换到 Instrument 页面，设定及修改 PCR 热循环程序。

6. 启动扩增

点 Save 按钮保存文件设置。确认 96 孔板或全部样品管在主机内放置妥当后，点击 Start 按钮，开始 PCR 循环。屏幕上动态显示 PCR 进程和剩余时间。

7. 监控进程

切换到 Results 页面的 Amp Plot 子页面，可以实时显示 PCR 曲线随着循环增加而逐步增长的实际情况。如果 Detector 选 FAM 或 VIC，只显示对应探针的变化情况；如果选 All，则同时显示所有探针的反应进程。

8. 保存结果

程序结束后，点 Disconnect 按钮，然后由 File → Save 保存实验结果。可以保存为". sds"格式，也可以保存为". sdt"格式，作为以后同类实验的模板，节省软件设置时间。

9. 数据分析

切换到 Result 页面，进入扩增曲线（Amplification Plot）子页面，利用软件分析实验结果。

10. 实验报告

切换到 Report 子页面，察看实验报告。确认无误后，保存结果。也可以从 File 菜单中选择 Export，再选择数据类型，输出数据，包括 Ct 值、相对信号强度、原始数据、熔解曲线数据和实验结果等。输出的数据可以用 Excel 打开，并可在 Excel 中重新生成扩增曲线、标准曲线等图谱。

第二十章　荧光分光光度计

荧光分光光度计是用于扫描液相荧光标记物所发出的荧光光谱的一种仪器。其能提供包括激发光谱、发射光谱以及荧光强度、量子产率、荧光寿命、荧光偏振等多种物理参数，从各个角度反映了分子的成键和结构情况。通过对这些参数的测定，不但可以做一般的定量分析，而且还可以推断分子在各种环境下的构象变化，从而阐明分子结构与功能之间的关系。荧光分光光度计的激发波长扫描范围一般是 190～650nm，发射波长扫描范围是 200～800nm。可用于液体、固体样品（如凝胶条）的光谱扫描。

荧光光谱法具有灵敏度高、选择性强、用样量少、方法简便、工作曲线线性范围宽等优点，可以广泛应用于生命科学、医学、药学和药理学、有机和无机化学等领域。

一、基本结构与原理

由高压汞灯或氙灯发出的紫外光和蓝紫光经滤光片照射到样品池中，激发样品中的荧光物质发出荧光，荧光经过滤和反射后，被光电倍增管所接收，然后以图片或数字的形式显示出来。

荧光分光光度计基本结构和原理如图 20-1 所示，光源与检测器成直角方式安排。

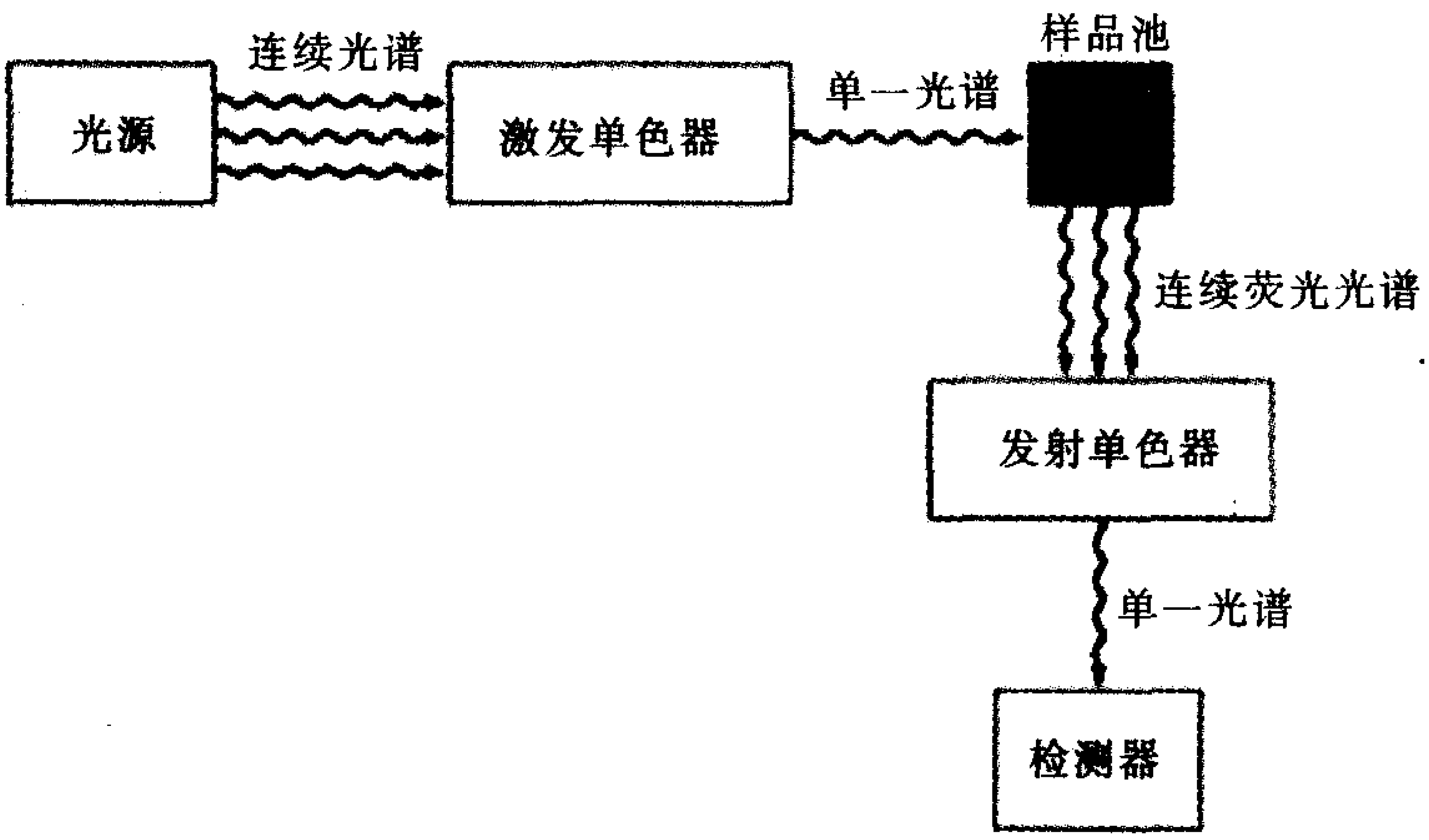


图 20-1　荧光分光光度计基本结构和原理图

1. 光源

为高压汞蒸气灯或氙弧灯，后者能发射出强度较大的连续光谱，且在 300～400nm 范围内强度几乎相等，故较常用。

2. 激发单色器

置于光源和样品室之间的为激发单色器或第一单色器，可以筛选出特定的激发光谱。

3. 发射单色器

置于样品室和检测器之间的为发射单色器或第二单色器，常采用光栅为单色器，可以筛选出特定的发射光谱。

4. 样品室

通常由石英池（液体样品用）或固体样品架（粉末或片状样品）构成。测量液体时，光源与检测器成直角安排；测量固体时，光源与检测器成锐角安排。

5. 检测器

一般用光电管或光电倍增管作检测器。可将光信号放大并转为电信号。

二、AMINCO-Bowman 扫描荧光分光光度计

Aminco Bowman Series 2 型荧光分光光度计（如图 20-2 所示），是目前最新的扫描荧光分光光度计，具有独特的双光源设计。

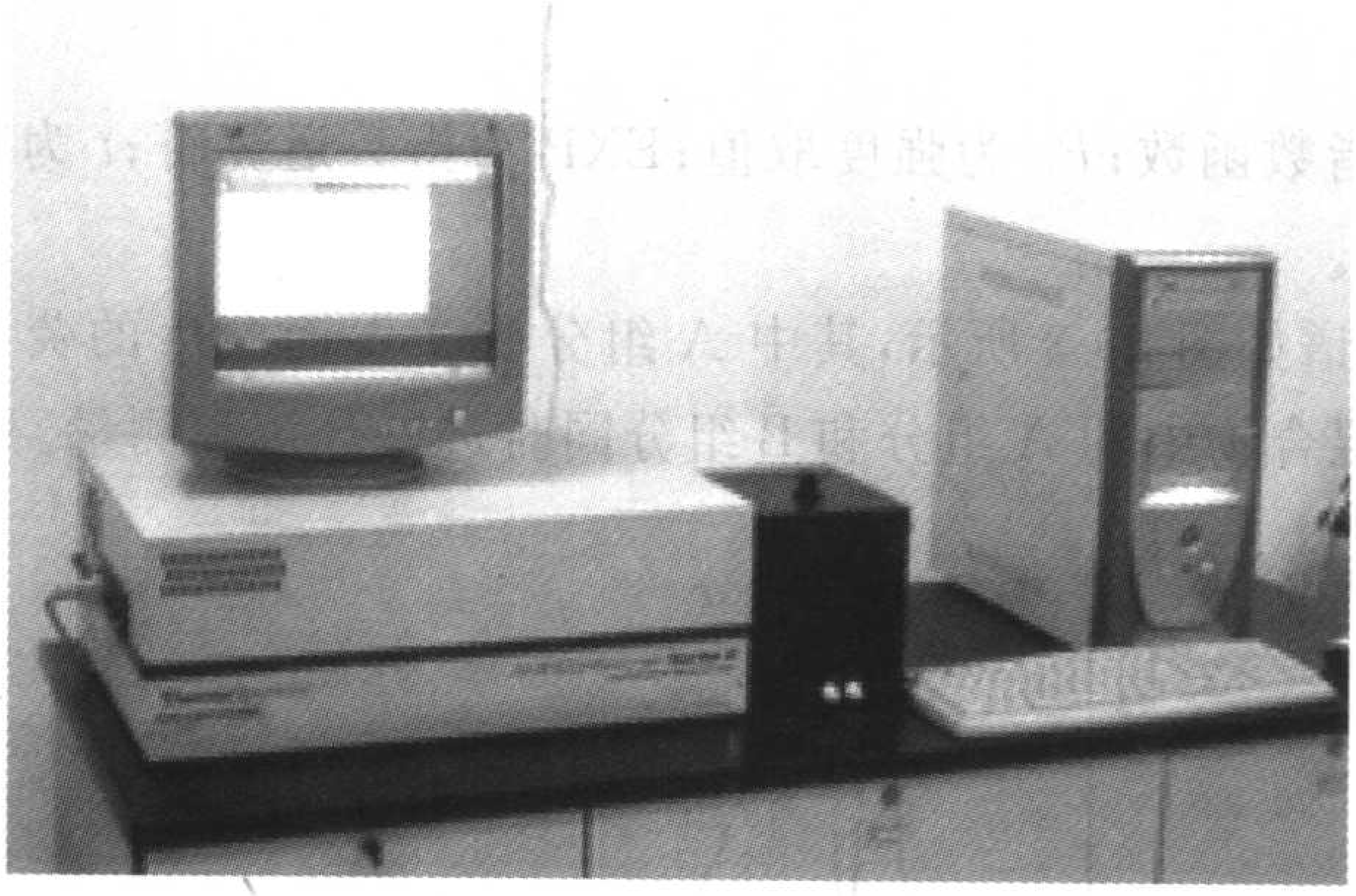


图 20-2　Aminco Bowman Series 2 型荧光分光光度计

（一）结构特点

1. 氙灯、闪光灯

150W 连续照明灯的光照强度足以进行灵敏度很高的荧光测量；闪光灯既可用于荧光测量，又可用于磷光测量。可根据自己的分析要求选择一种或两种光源。

2. 单色器

均为 Seya-Namioka 设计，采用凹面全息光栅和为数极少的反射镜，既简单又耐

用,不需要现场校准。计算机驱动光栅,控制狭缝,既准确(+/− 0.1nm)又快(12 000nm/min),可靠性高。

3. 光电倍增管检测器

光电倍增管(PMT)有两种工作模式:

(1) 模拟——高灵敏度,宽动态范围,操作方便;

(2) 光子计数——提供极高的灵敏度,联结式盖锁可保护 PMT。

4. 附件

T-Optics 多功能样品室可配多种附件,完成多种应用。

(二) 功能特点

1. 荧光发射光谱

选择某一固定波长的光激发样品,记录样品中产生的荧光发射强度与发射波长间的函数关系,即得荧光发射光谱。

2. 荧光激发光谱

选定某一荧光发射波长记录荧光发射强度作为激发光波长的函数,即得荧光激发光谱。

3. 时间分辨技术

可用于对混合物中光谱重叠但有寿命差异的组分进行分辨并分别测量。

时间分辨荧光测定公式如下:

$$P_{(t)} = P_0\ \mathrm{EXP}(-t/\tau)$$

式中:

$P_{(t)}$ 为拟合指数函数;P_0 为强度取值;EXP 为指数运算符;t 为时间取值;τ 为荧光平均时间寿命。

时间荧光光谱如图 20-3 所示,其中 A 组分受激发而产生的荧光寿命短于 B 组分,因此可以对混合物中的 A 组分和 B 组分同时进行分辨和测量。

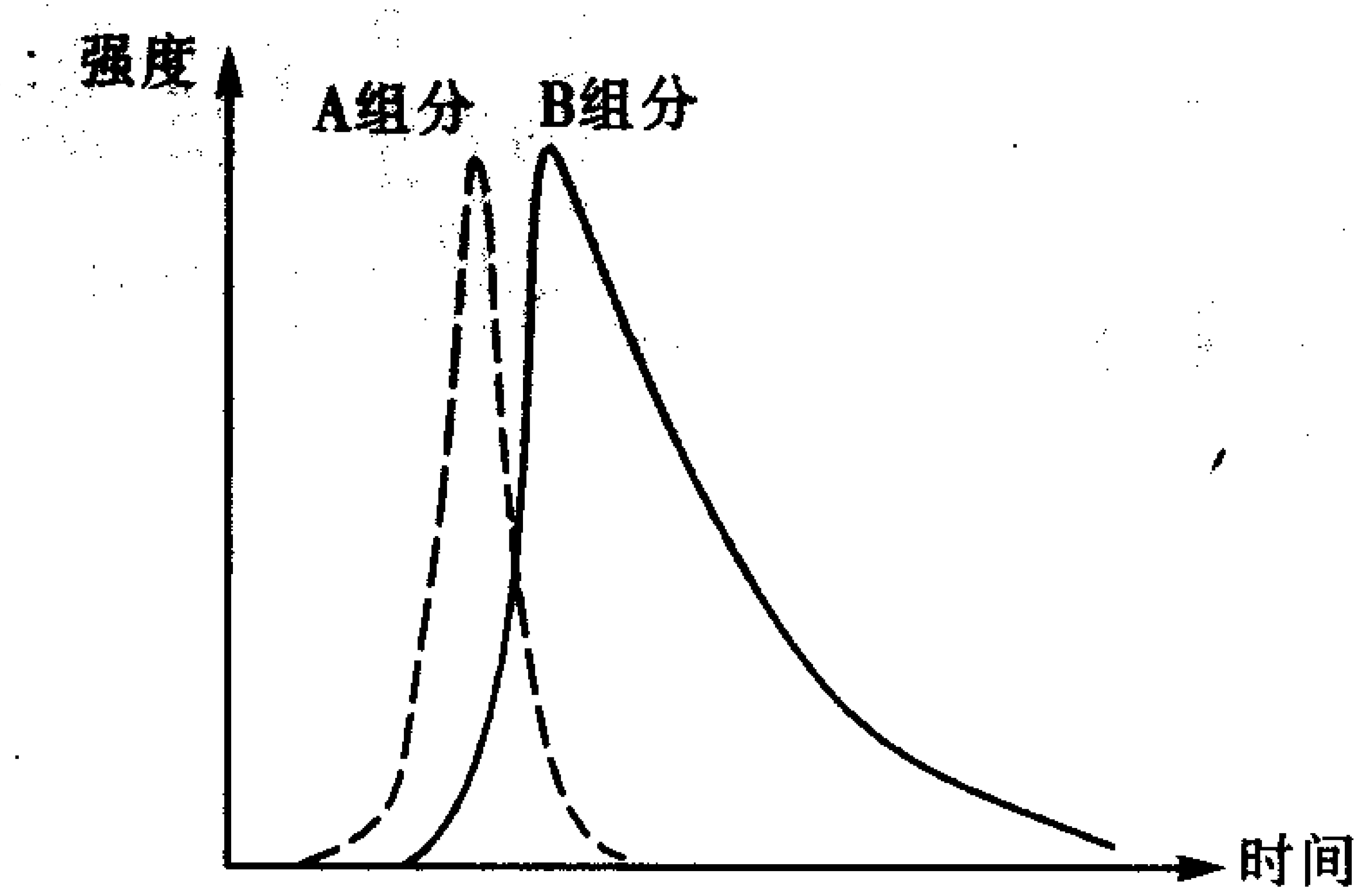


图 20-3 时间荧光光谱

4. 偏振和各向异性技术

荧光偏振和各向异性的测量揭示了荧光体吸收光子和随后发射光子的平均角

移。偏振度与荧光体转动速度成反比，可用于测定抗体和抗原的含量。

5. 同步扫描技术

同步荧光技术是在同时扫描激发和发射波长的情况下来测绘荧光光谱图。由测得的荧光信号强度对发射或激发波长作图，即为同步荧光光谱。它包括固定波长的同步荧光和固定能量的同步荧光两种光谱。

(1) 固定波长的同步荧光光谱。在同步扫描中，使激发波长和发射波长保持固定的波长间距，即在"$\Delta\lambda=\lambda em-\lambda ex=$常数"的情况下进行扫描，以同步荧光信号(相对强度)对发射或激发波长测绘荧光光谱图，则为固定波长的同步荧光光谱。在同步扫描的荧光测定中，同步荧光信号强度 Is 是激发波长的函数，其基本公式为：

$$Is(\lambda ex,\lambda em)=KcbEx(\lambda ex)\ Em(\lambda em)$$

式中，c 为待测物质的质量浓度，b 为试样溶液的厚度，K 为实验条件下某常数，Ex 为激发光谱的强度分布，Em 为发射光谱的强度分布。由公式可知，在实验条件保持固定的情况下，测试物质的同步荧光信号强度与待测物质的质量浓度成正比。这是定量分析的依据。在利用同步荧光测试样品前，K 值必须慎重选择，只有当 $\Delta\lambda$ 恰好为某吸收带和其发射带之间的波长间距时，才能观察到同步信号。

(2) 固定能量的同步荧光光谱。固定能量的同步荧光光谱是指在同步扫描过程中，使激发波长与发射波长之间保持着固定的能量差，即使得 $\Delta\upsilon=(1/\lambda ex-1/\lambda em)\times10^7$ 为常数，$\Delta\upsilon$ 表示波数差(cm^{-1})。固定能量的同步荧光法与固定波长的同步荧光法相比较，后者能消除瑞利散射，但是不能消除喇曼散射，反而使喇曼散射加宽。固定能量的同步荧光法既能消除瑞利散射，又可消除喇曼散射，这有利于分析方法灵敏度和精密度的提高，故一般选用前一种方法。

同步荧光光谱特点如下：

(1) 使光谱简化；

(2) 使谱带窄化；

(3) 减少光谱重叠；

(4) 减少散射光影响。

6. 三维光谱

能获得激发波长和发射波长同时变化的光强度信息，有等高线图和三维投影图两种形式。三维荧光光谱法是 20 年前提出的一种荧光分析新方法。特别是最近提出的三维荧光偏振光谱在研究溶液中荧光物质分子的行为特征方面具有较大的优越性。三维荧光光谱是由激发波长(Y 轴)-发射波长(X 轴)-荧光强度(Z 轴)三维坐标所表征的矩阵光谱(excitation-emission-matrix spectra)，也叫总发光光谱(total luminescence spectra)，显然该技术可获得激发波长(λex)与发射波长(λem)同时变化时的荧光强度信息。三维荧光光谱图的表示方式有三种，即三维投影图(isometric projection)、激发发射矩阵(EEM)以及等高线(contour plot)荧光光谱图。用三维投影方式表示的荧光光谱，比较直观，较容易从图上观察到荧光峰的位置和高度以及光

谱的某些特性。三维荧光光谱图，由于比二维的平面图多了一个坐标，所得的总荧光数据又比普通荧光光谱多得多，故具有高选择性。

7. 高效液相检测技术

荧光光谱分析法在高效液相技术中的应用，极大地丰富了高效液相的样品检测技术。

三、基本操作

（一）样品准备

1. 液体样品

根据用户提供的技术指标，检查浓度范围是否合适，如果需要稀释，则要考虑所需溶剂类型和稀释倍数。

2. 固体样品

均匀粉末、片状或具有光滑平面的块状样品，均可直接测定。

（二）操作步骤

1. 开机

接通电源，打开主机开关，打开光源后，启动计算机。

2. 检测前准备

参照仪器说明书，在 20 天内至少进行一次激发校准和发射校准，检测前仪器应预热。

3. 工作条件的选择

环境温度应在 20±5℃；相对湿度不大于 70%；电源稳定，无磁场、电场干扰。根据样品的特性及荧光强度，选择合适的仪器工作条件（如狭缝、PMT 增益、响应时间等）。

4. 基本测定

（1）荧光激发光谱测定。设置仪器参数，扫描发射波长，找到 λem 最大值，以此为发射波长，记录发射强度作为激发波长的函数，便得到激发光谱。

（2）荧光发射光谱测定 。设置仪器参数，扫描激发波长，找到 λex 最大值，以此为激发波长，记录发射强度与发射波长间的函数关系，便得到荧光发射光谱。

（3）差谱测定。设置仪器参数，选择合适的工作方式，测定背景溶液的发射光谱并储存起来，在一定的工作方式下，扫描样品溶液的发射波长，得到当时的光度值和储存的背景值之间的差示值，即差谱。

（4）峰面积积分。选择适当的工作方式，对光谱曲线进行积分操作，即得到峰面积积分。

（5）荧光强度。选择合适的测量参数，设置 λex、λem，采用定点读数或扫描方式，即可测得所选波长处的荧光强度。

（6）定量测定 。配制一系列已知浓度的标准溶液，在一定的测定条件下，设置

λex、λem，按照由稀至浓的次序，测定标准溶液的荧光强度，绘制荧光强度—浓度的工作曲线，不改变仪器参数测定未知溶液的荧光强度，由工作曲线即可求出未知溶液的浓度。

（三）分析结果的表述

（1）荧光激发光谱、发射光谱以及其他光谱由仪器的控制计算机直接绘出。

（2）峰面积积分、荧光强度由仪器控制计算机计算显示。

（3）定量测试：在相同的测定条件下，测定一系列已知浓度的标准溶液的荧光强度，绘制出荧光强度—浓度的工作曲线。浓度未知的溶液的荧光强度测定后，由工作曲线求出该溶液的浓度。

（四）注意事项

（1）在实验开始前，应提前打开仪器预热，并配制好所需的溶液，置于4℃冰箱中保存，放置时间超过一星期的溶液要重新配制。

（2）实验所用的样品池是四面透光的石英池，拿取的时候用手指掐住池体的上角部，不能接触到四个面，清洗样品池后应用擦镜纸对其四个面进行轻轻擦拭。

（3）在测试样品时，注意荧光强度范围的设定不要太高，以免测得的荧光强度超过仪器的测定上限。

（4）实验结束后，要及时地清理台面，处理废液，清洗和放置好样品池，将下次要用的溶液放回冰箱，并且按规定登记实验记录。

第二十一章　激光扫描成像仪

Typhoon 8600 激光扫描成像仪是一种多功能的成像装置，如图 21-1 所示。其可进行多色荧光、无底片的放射自显影（利用 storage phosphor）和化学发光样品的成像。与激光扫描成像仪连接的计算机上安装有一个功能强大的图像分析软件包 ImageQuant，利用它可以显示所扫描的图像，对目标进行监测、定性和定量分析并对定量结果的数据加以分析。如果用一个比较简单直观的方式来形容 Typhoon 系统的话，它类似于我们平时使用的普通计算机上的扫描仪，只不过它的光源换成了多波长的激光器，样品由普通的纸张变成了生物样品，控制仪器的软件功能更加强大。

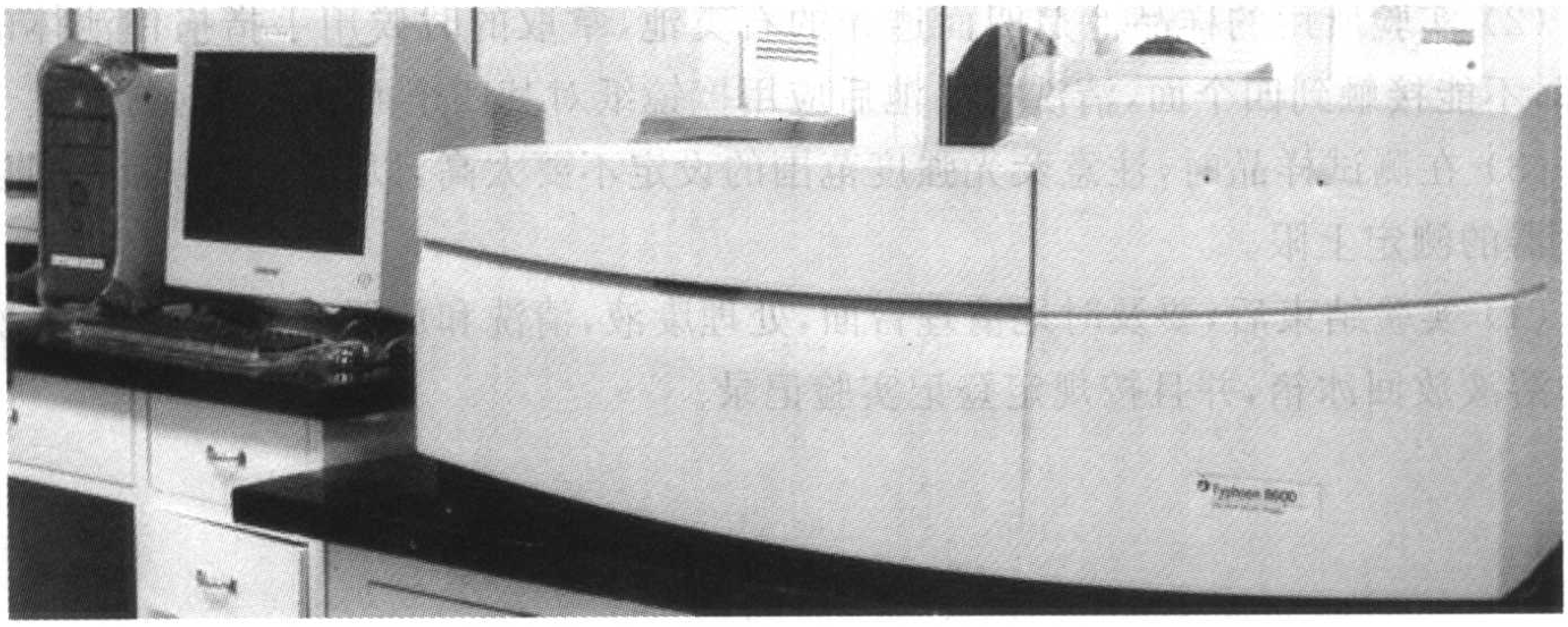


图 21-1 激光扫描成像仪外观

一、系统硬件组成及功能

(1) Typhoon 仪器（typhoon instrument）——扫描经过曝光的磷屏、荧光样品或化学发光样品。

(2) 清屏器（image eraser）——清洁磷屏以备再次使用。

(3) 磷屏（storage phosphor screen）——从放射性样品上获得图像并暂时保存。

(4) 曝光盒（exposure cassette）——用于存放磷屏，提供曝光所需的避光环境。

二、工作原理及操作步骤

用 Typhoon 8600 激光扫描成像仪进行样品扫描和处理的顺序如下：

(1) 打开并预热 Typhoon 仪器主机，每次开机后必须在指示灯由红变绿后，再

等待大约 30 min 才能进行第一次扫描，否则将会影响到信号收集的准确性。然后打开计算机。

(2) 将曝光的磷屏、荧光样品或化学发光样品放到仪器的玻璃压盘上。

(3) 使用扫描控制软件来选择与要扫描的样品种类相适应的设置，开始扫描。

(4) 磷屏或样品以如下三种方式发射光线：

当红色激光(633nm)照射到已曝光的磷屏上的每个像素部分时，磷发射出蓝光。

当绿色(532nm)或红色(633nm)激光扫描到荧光样品的每个像素部分时，荧光样品放射出具特有特征光谱的光。

化学发光样品自发地发射出特征光谱。

(5) 光学系统收集这些样品发出的光。如果选择了一个或多个发射滤光器，光学系统则会使特定波长的光线通过所选的特定滤光器。每个滤光器只允许波长在其带宽范围内的光线通过，并到达光电倍增管(PMT)。

(6) PMT 将收集到的光信号转变成相应的电信号，电信号的强弱与随着光信号的密度变化而变化。来自 PMT 的模拟信号转变成数字信息，并储存在计算机硬盘上。

扫描结束后，用 Image Quent 软件可将信息映像成为显示器上相应的像素，从而生成原始样品的精确图像。Image Quent 能够定量表示信号的差异，信号的强弱与放射性、荧光或化学发光在样品中的量成正比。

(7) 关闭 Typhoon 系统主机及计算机。

三、仪器参数

电源：10A，220～240V；

行频率：50～60Hz；

环境温度：15℃～35℃；

环境湿度：10%～80%相对湿度，无冷凝。

四、荧光样品的制备

Typhoon 8600 系列多功能图像系统具有高灵敏度、高通量、多重检测模式等特点。它可以检测多色荧光、磷屏和化学发光样品，能够有效地针对 PCR 产物、2-D 蛋白质电泳凝胶、膜阵列、杂交、组织切片等，甚至是微阵列芯片。它的光学系统和低且均一的背景使荧光检测可以达到极大的检测极限并获得均一的图像。在Typhoon上可以进行任何样品的多色荧光图像分析，不论是厚的、薄的、湿或干的样品。可以检测范围广泛的各种染料，并可选择磷屏检测荧光或化学发光检测模式。下面简单介绍一下荧光样品的制备。

由于荧光样品需要高灵敏度或高精度的定量分析，经过长期的测试，归纳出下面几种样品材料来源具有较低的背景，对结果的干扰的大小。

（1）凝胶——背景荧光的干扰随着凝胶本身的厚度增加而增强，所以我们在实验中要根据需要选择尽量薄的凝胶，比较常用的有琼脂糖凝胶。

FMC SeaKem Gold 和 LE 的琼脂糖具有较低的背景干扰。如果实验中需要用到其他类型的凝胶，可以预先做个空白凝胶的扫描测试，以确定背景对实验结果的干扰的大小。浇注凝胶的时候要注意混合均匀，不能有气泡。扫描时，应把凝胶从模具上取下，再放在 Typhoon 上进行测试。如果目标与玻璃压盘间的距离超过 4mm，那么在扫描控制软件中要选中"+3mm focal plane"设置，让激光头扫描的位置提升 3mm，以确保样品在扫描范围内。

（2）电泳玻璃板——选用低荧光背景的玻璃板，并且保证 3mm 的厚度，因为软件中的"+3mm focal plane"设置是为 3mm 厚的板设定的。

（3）透明薄膜——必须预先测试其荧光强度。

（4）Miroplates 和 Microplate strips。

（5）透明支撑物——为了避免样品对仪器造成污染，可以将样品用透明的塑料膜包起来。同样，这种透明支撑物也需要预先测定荧光强度。

（6）试剂——用光谱纯级别的试剂可以达到最低的自发荧光。

附录　免疫细胞化学常用试剂及其配制方法

第一节　缓冲液

免疫细胞化学中应用的缓冲液种类较多，即使是同种缓冲液，其浓度、pH、离子强度等也常常有所不同。在此介绍几种最常用缓冲液的配制。

一、0.2mol/L(pH 7.4)磷酸缓冲液(phosphate buffer，PB)

1. 试剂

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 和 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$。

2. 配制方法

配制时，常先配制 0.2mol/L 的 NaH_2PO_4 和 0.2mol/L 的 Na_2HPO_4，两者按一定比例混合即成 0.2mol/L 的磷酸盐缓冲液(PB)，根据需要可配制不同浓度的 PB。

(1) 0.2mol/L 的 NaH_2PO_4：称取 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 31.2g(或 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 27.6g)，加重蒸水至 1 000mL 溶解。

(2) 0.2mol/L 的 Na_2HPO_4：称取 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.632g(或 $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 53.65g 或 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 35.61g)，加重蒸水至 1 000mL 溶解。

(3) 0.2mol/L pH 7.4 的 PB 的配制：取 19mL 0.2mol/L 的 NaH_2PO_4 和 81mL 0.2mol/L 的 Na_2HPO_4，充分混合即为 0.2mol/L 的（pH 约为 7.4～7.5）。若 pH 偏高或偏低，可通过改变二者的比例来加以调整，室温保存即可。用双蒸水稀释一倍即可得到 0.2mol/L PB。

3. 不同 pH 时的磷酸盐缓冲液(PB)的量取

pH	0.2mol/L Na_2HPO_4 (mL)	0.2mol/L NaH_2PO_4 (mL)	pH	0.2mol/L Na_2HPO_4 (mL)	0.2mol/L NaH_2PO_4 (mL)
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
5.9	10.0	90.0	7.1	67.0	33.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.1	15.0	85.0	7.3	77.0	23.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.3	22.5	77.5	7.5	84.0	16.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.5	31.5	68.5	7.7	89.5	10.5
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.7	43.5	56.5	7.9	93.0	7.0
6.8	49.0	51.0	8.0	94.7	5.3
6.9	55.0	45.0			

二、0.01mol/L 磷酸盐缓冲生理盐水(phosphate buffered saline,PBS)

1. 试剂

0.2mol/L PB 50mL、NaCl 8.5～9g(约 0.15mol/L)、重蒸水 1 000mL。

2. 配制方法

称取 NaCl 8.5～9g 及 0.2mol/L 的 PB 50mL,加入到 1 000mL 的容量瓶中,最后加重蒸水至 1 000mL,充分摇匀即可。若拟配制 0.02mol/L 的 PBS,则 PB 量加倍即可,依此类推。

3. 应用

PB 和 PBS 是免疫细胞化学实验中最为常用的缓冲液,0.01mol/L 的 PBS 主要用于漂洗组织标本及稀释血清等,其 pH 应在 7.25～7.35 之间,否则需要调整。0.1mol/L的 PB 常用于配制固定液、蔗糖等。一般情况下,0.2mol/L PB 的 pH 值稍高些,稀释成 0.01mol/L 的 PBS 时,常可达到要求的 pH 值,若需调整 pH,通常是调整 PB 的 pH。

三、Karasson-Schwlt 磷酸盐缓冲液

1. 试剂

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 3.31g、$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 3.77g、重蒸水至 1 000mL。

2. 配制方法

同上述 PBS 的配制方法。

3. 应用

该缓冲液主要用于配制 Zamboin's 固定液。

四、0.5mol/L(pH 7.6)Tris-HCl 缓冲液

1. 试剂

Tris(三羟甲基氨基甲烷)60.57g、1mol/L HCl 约 420mL、重蒸水 1 000mL。

2. 配制方法

先以少量重蒸水(300～500 mL)溶解 Tris,加入 HCl 后,用 1mol/L 的 HCl 或 1mol/L 的 NaOH 将 pH 调至 7.6,最后加重蒸水至 1 000mL。此液为储备液,于 4℃ 冰箱中保存。免疫细胞化学中常用的 Tris-HCl 缓冲液浓度为 0.05mol/L,用时取储备液稀释 10 倍即可。

3. 应用

该液主要用于配制 Tris 缓冲生理盐水(TBS)、DAB 显色液。

五、Tris 缓冲生理盐水 (tris buffered saline,TBS)

1. 试剂

0.5mol/L Tris-HCl 缓冲液 100mL、NaCl 3.5～9g(0.15mol/L)、重蒸水 1 000mL。

2. 配制方法

先以重蒸水溶解少许 NaCl,再加 Tris-HCl 缓冲液,最后加重蒸水至1 000mL,充分摇匀使 Tris 终浓度为 0.05mol/L。

3. 应用

TBS 主要用于漂洗标本,常用于免疫酶技术中。

六、Tris-TBS(PBS)

1. 试剂

Triton X-100 10mL(1%)或 3mL(0.3%)、0.5mol/L Tris 缓冲液(pH 7.6) 1 000mL(50mL)或 0.2mol/L 的 PB、NaCl 8.5～9g、重蒸水 1 000mL。

2. 配制方法

先以重蒸水溶解少许 NaCl 后,加入 Triton X-100 及 Tris 缓冲液(或 PB),最后加重蒸水至 1 000mL,充分摇匀。

3. 应用

该液常用浓度为 1%及 0.3%,前者主要用于漂洗标本,后者主要用于稀释血清。

七、0.1mol/L(pH 7.4)二甲胂酸钠缓冲液

1. 试剂

0.2mol/L 二甲胂酸钠 500mL、0.1mol/L HCl 28mL、蒸馏水 1 000mL。

2. 配制方法

先称取二甲胂酸钠(分子量为 214)42.8g,加蒸馏水至 1 000mL,配制0.2mol/L的二甲胂酸钠溶液;再取 HCl 1.7mL 加蒸馏水至 1 000mL,配成0.1mol/L;最后取0.2mol/L二甲胂酸钠溶液 500mL 及 0.1mol/L HCl 28mL 混合,加蒸馏水至1 000mL,即为 0.1mol/L 的二甲胂酸钠缓冲液。

八、几种常用的不同 pH 值缓冲液的配制表

1. 1/15mol/L 磷酸氢二钠—磷酸二氢钾缓冲液(pH 4.92~8.18)

pH	1/15 mol/L Na_2HPO_4(mL)	1/15 mol/L KH_2PO_4(mL)	pH	1/15 mol/L Na_2HPO_4(mL)	1/15 mol/L KH_2PO_4(mL)
4.92	0.10	9.9	7.17	7.00	3.00
5.29	0.50	9.50	7.38	8.00	2.00
5.91	1.00	9.00	7.73	9.00	1.00
6.24	2.00	8.00	8.04	9.50	0.50
6.47	3.00	7.00	8.34	9.75	0.25
6.64	4.00	6.00	8.67	9.90	0.10
6.81	5.00	5.00	8.18	10.00	0.00
6.98	6.00	4.00			

注:$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 分子量=178.08;1/15 mol/L 溶液为 11.876 g/L

KH_2PO_4 分子量=136.09;1/15 mol/L 溶液为 9.078 g/L

2. 0.2mol/L 醋酸盐缓冲液(pH 3.6~5.6)

pH	0.2 mol/L 醋酸(mL)	0.2 mol/L 醋酸钠(mL)	pH	0.2 mol/L 醋酸(mL)	0.2 mol/L 醋酸钠(mL)
3.6	46.3	3.7	4.8	20.0	30.0
3.8	44.0	6.0	5.0	14.8	35.2
4.0	41.0	9.0	5.2	10.5	39.5
4.2	36.8	13.2	5.4	8.8	41.2
4.4	30.5	19.5	5.6	4.8	45.2
4.6	25.5	24.5			

3. 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.19～5.6)

pH	0.2mol/L Tris(mL)	0.2mol/L HCl(mL)	H_2O	pH	0.2mol/L Tris(mL)	0.2mol/L HCl(mL)	H_2O
7.19	10.0	18.0	12.0	8.23	10.0	9.0	21.0
7.36	10.0	17.0	13.0	8.32	10.0	8.0	22.0
7.54	10.0	16.0	14.0	8.41	10.0	7.0	23.0
7.66	10.0	14.0	15.0	8.51	10.0	6.0	24.0
7.77	10.0	14.0	16.0	8.62	10.0	5.0	25.0
7.87	10.0	13.0	17.0	8.74	10.0	4.0	26.0
7.96	10.0	12.0	18.0	8.92	10.0	3.0	27.0
8.05	10.0	11.0	19.0	9.10	10.0	2.0	28.0
8.14	10.0	10.0	20.0				

4. 0.1mol/L Tris-HCl 二甲胂酸钠缓冲液(pH 5.0～7.4)

pH	0.2mol/L 二甲胂酸钠(mL)	0.2mol/L HCl(mL)	蒸馏水	pH	0.2mol/L 二甲胂酸钠(mL)	0.2mol/L HCl(mL)	蒸馏水
5.0	25	23.5	51.5	6.4	25	9.2	65.8
5.2	25	22.5	52.5	6.6	25	6.7	68.3
5.4	25	21.5	53.5	6.8	25	4.7	70.3
5.6	25	19.6	55.5	7.0	25	3.2	71.8
5.8	25	17.4	57.5	7.2	25	2.1	72.9
6.0	25	14.8	60.3	7.4	25	1.4	73.6
6.2	25	11.9	63.1				

注：HCl 可由 H_2CO_3 代替，配制成二甲胂酸钠-HCO_3 缓冲液

5. 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.2～10.7)

pH	0.2mol/L Na_2CO_3 (mL)	0.2mol/L Na_2HCO_3 (mL)	pH	0.2mol/L Na_2CO_3 (mL)	0.2mol/L Na_2HCO_3 (mL)
9.2	4.0	46.0	10.0	27.5	22.5
9.3	7.5	42.5	10.1	30.0	20.0
9.4	9.5	40.5	10.2	33.0	17.0
9.5	13.0	37.0	10.3	35.5	14.5
9.6	16.0	34.0	10.4	38.5	11.5
9.7	19.5	30.5	10.5	40.5	9.5
9.8	22.0	28.0	10.6	42.5	7.5
9.9	25.0	25.0	10.7	45.0	5.0

第二节 固 定 剂

大多数神经激素、肽类物质为水溶性的，在用于免疫细胞化学研究之前，常需固定。但肽类和蛋白质的物理、化学性质不同，因而对不同的固定方法及固定剂的反应也不尽相同。某些固定剂甚至可同时破坏和（或）保护同一抗原的不同抗原决定簇。因此，在进行免疫细胞化学研究之前，很有必要了解所要研究物质（蛋白质或肽类）的化学性质，并根据需要来选择适宜的固定剂（或固定方法）以及改进固定条件。

目前，免疫细胞化学研究中常用的固定剂仍为醛类固定剂，其中以甲醛类和戊二醛最为常用。以下简要介绍几种目前较为常用的固定剂，可根据需要选用。

一、4%多聚甲醛-0.1mol/L 磷酸缓冲液（pH 7.3）

1. 试剂

多聚甲醛 40g、0.1mol/L 磷酸缓冲液至 1 000mL。

2. 配制方法

称取 40g 多聚甲醛，置于三角烧瓶中，加入 500～800mL 0.1mol/L 磷酸缓冲液（phosphate buffer，以下简称 PB），加热至 60℃左右，持续搅拌（或磁力搅拌）使粉末完全溶解，通常需滴加少许 1mol/L NaOH 才能使溶液清亮，再用 1mol/L HCl 将 pH 调至 7.2～7.4，最后补足 0.1mol/L 的 PB 于 1 000mL，充分混匀。

3. 应用

该固定剂较适于光镜免疫细胞化学研究，最好是动物经灌注固定取材后，继续浸泡固定 2～24h。另外，该固定剂较为温和，适于组织标本的较长期保存。

二、4%多聚甲醛-磷酸二氢钠/氢氧化钠

1. 试剂

A 液：多聚甲醛 40g、蒸馏水 400mL；

B 液：$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 16.88g、蒸馏水 300mL；

C 液：NaOH 3.86g、蒸馏水 200mL。

2. 配制方法

A 液最好在 500mL 的三角烧瓶中配制（方法同前），至多聚甲醛完全溶解后冷却待用。注意：在溶解多聚甲醛时，要尽量避免吸入气体或使液体溅入眼内。B 液和 C 液配制好后，将 B 液倒入 C 液中，混合后再加入 A 液，以 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 将 pH 调至 7.2～7.4。最后，补充蒸馏水至 1 000mL 充分混合，4℃冰箱保存

备用。

3. 应用

该固定剂适于光镜和电镜免疫细胞化学研究，用于免疫电镜时，最好加入少量新鲜配制的戊二醛，使其终浓度为0.5%～1%。该固定剂较温和，适于组织的长期保存。组织标本放于该固定液中，4℃冰箱保存数月仍可获得满意的染色效果。

三、Bouin液及改良Bouin液

1. 试剂

饱和苦味酸700mL、40%甲醛250mL、冰醋酸50mL。

2. 配制方法

先将饱苦味酸过滤，加入甲醛(有沉淀者禁用)，最后加入冰醋酸，混合后存于4℃冰箱中备用。冰醋酸最好在用前加入。改良Bouin液不加冰醋酸。

3. 应用

该固定液为组织学、病理学常用固定剂之一，对组织的穿透力较强，固定较好，结构完整。但因偏酸性(pH为3～3.5)，对抗原有一定损害，且组织收缩较明显，故不适于组织标本的长期保存。此外，操作时应避免吸入气体或与皮肤接触。

四、Zamboni(stefanini)液

1. 试剂

多聚甲醛20mL、饱和苦味酸150mL、Karasson-Schwlt PB至1 000mL。

2. 配制方法

称取多聚甲醛20g，加入饱和苦味酸150mL，加热至60℃左右，持续搅拌使充分溶解、过滤及冷却后，加Karasson-Schwlt PB至1 000mL充分混合(Karasson-Schwlt磷酸缓冲液的配制方法见本章第一节)。

3. 应用

该固定液适于电镜免疫细胞化学，对超微结构的保存比纯甲醛好，也适于光镜免疫细胞化学研究，为实验室常用固定剂之一。我们在应用中，常采用2.5%的多聚甲醛和30%的饱和苦味酸，以增加其对组织的穿透力和固定效果而保存更多的组织抗原，固定时间为6～18h。

五、PLP液(periodate-lysine-paraformaldehyde fixative 过碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛固定液)

1. 试剂

过碘酸钠、赖氨酸盐酸盐(或盐酸赖氨酸)、多聚甲醛、蒸馏水。

2. 配制方法

(1) 贮存液 A(0.1mol/L 赖氨酸-0.5mol/L Na_3PO_4, pH 7.4):称取赖氨酸盐酸盐 1.827g 溶于 50mL 蒸馏水中,得到 0.2mol/L 的赖氨酸盐酸盐溶液,然后加入 Na_2HPO_4 至 0.1mol/L,将 pH 调至 7.4,补足 0.1mol/L 的 PB 至 100mL,使赖氨酸浓度也为 0.1mol/L,4℃ 冰箱保存,最好两周内使用。此溶液的渗透浓度为 0.3mmol/L。

(2) 贮存液 B(8%多聚甲醛溶液):称 8g 多聚甲醛加入 100mL 蒸馏水中,配成 8%多聚甲醛液。过滤后 4℃冰箱保存。

(3) 临用前,以 3 份 A 液与 1 份 B 液混合,再加入结晶过碘酸钠($NaIO_4$),使 $NaIO_4$ 终浓度为 2%。由于 A、B 两液混合,pH 从约 7.5 降至 6.2,故固定时不需再调 pH 值。固定时间为 6～18h。

3. 应用

该固定剂较适于富含糖类的组织,对超微结构及许多抗原的抗原性保存较好。其机制是借助于过碘酸氧化组织中的糖类形成醛基,通过赖氨酸的双价氨基与醛基结合,从而与糖形成交联。由于组织抗原绝大多数都是由蛋白质和糖两部分构成,抗原决定簇位于蛋白部分,故该固定剂有选择性地使糖类固定,这样既稳定了抗原,又不影响其在组织中的位置关系。Mclean 和 Nakane 等认为,最佳的组合是含 0.01mol/L的过碘酸盐、0.075mol/L 的赖氨酸、2%的多聚甲醛及 0.037mol/L 的磷酸缓冲液。

六、Karnovsky 液(pH 7.3)

1. 试剂

多聚甲醛 30g、25%戊二醛 80mL、0.1mol/L PB 至 1 000mL。

2. 配制方法

先将多聚甲醛溶于 0.1mol/L PB 中,再加入戊二醛,最后加入 0.1mol/L 的 PB 至 1 000mL,混匀。

3. 应用

该固定剂适于电镜免疫细胞化学,用该固定液在 4℃短时固定,比在较低浓度的戊二醛中长时间固定能更好地保存组织的抗原性和细微结构。固定时最好先灌注固定,然后浸泡固定 10～30min,用缓冲液漂洗后即可树脂包埋或经蔗糖溶液处理后用于恒冷切片。

七、0.4%对苯醌(parabenzoquinone)

1. 试剂

对苯醌 4.0g、0.01mol/L PBS 1 000mL。

2. 配制方法

称取 4.0g 对苯醌溶于 1 000mL 0.01mol/L 的 PBS 即可。

3. 应用

对苯醌对抗原具有较好的保护作用，但对超微结构有一定影响，故常与醛类固定剂混合使用。一般要求临用前配制，且避免加热助溶，因加热或放置时间过长，固定液变为棕色至褐色，会使组织标本背景增加，影响观察。此外，对苯醌有剧毒，使用时避免吸入或与皮肤接触。

八、PFG 液(parabenzoqulinone-formaldehyde-gutaraldehyde fixative)

1. 试剂

对苯醌 20g、多聚甲醛 15g、25%戊二醛 40mL、0.1mol/L 二甲酸钠缓冲液至 1 000mL。

2. 配制方法

先以 500mL 左右的二甲酸钠缓冲液溶解对苯醌及多聚甲醛，然后加入戊二醛，最后加入二甲酸钠缓冲液至 1 000mL 充分混合。

3. 应用

对苯醌与戊二醛及甲醛联合应用，即可阻止醛基对抗原的损害，又不影响超微结构的保存，故适于多种类抗原的免疫细胞化学，尤其是免疫电镜的研究。

九、碳二亚酰胺-戊二醛(ECD-G)液

1. 试剂

0.05mol/L PB 500mL、0.01mol/L PBS 500mL、Tris 约 14g、浓 HCl 少许、ECD 10g、25%戊二醛 3.5mL。

2. 配制方法

先以约 500mL 的 PB 与相同体积的 PBS 混合，加入 Tris(使其终浓度为 1.4%)溶解，以浓 HCl 调 pH 至 7.0。再将事先称取好的 ECD 和戊二醛加入混合液，振摇后计时，用 pH 计检测，约 2～3min 时，pH 降至 6.6。再以 1mol/L 的 NaOH 在 4min 内调 pH 至 7.0。此时，将该混合固定液加入盛有细胞(经 BPS 漂洗过)的器皿中，在 23℃固定 7min 后，以 PBS 洗去固定液，即可进一步处理。

3. 应用

ECD 即乙基-二甲基氨基丙基碳亚胺盐酸盐(1-ethyl-3(3-dimethy-aminoprpyl)-carboi-imide hydrochloride)，简称乙基-CDI，常用于多肽类激素的固定，对酶等蛋白质的固定也有良好效果。ECD 单独应用时，边缘固定效应重。但与戊二醛、Tris 及 PB 联合应用，效果明显改善，细胞质仍可渗透，利用细胞中抗原的定位，超微结构保

存较好。目前认为它是一种很好的用于培养细胞电镜水平免疫细胞化学研究的固定剂。

以上介绍了目前免疫细胞化学中常用的一些固定液。固定液种类还很多，如70%～90%的酒精、丙酮、醋酸酒精（含0.1%～1%醋酸的70%～90%酒精），这些溶液都能促使蛋白质凝固。它们最初只是光学显微镜通用的固定液，但在免疫细胞化学上用其他方法不成功时，也可试用。总之，掌握一个原则：免疫细胞化学中，含重金属的固定液禁用（但 Zenker-Formalin 可进行短时的固定）。目前多认为，对生物标本较好的固定措施是：用 4℃的 Karnovsky 液灌注固定 10～30min 后，接着在 pH 7.3 0.1mol/L 的二甲胂酸钠缓冲液中漂洗过液，这种短时冷固定处理，有助于超微结构和许多肽类抗原的保存。对其他较难保存的抗原可尝试 PFG、PLP 及 Zamboni液等混合固定液。

第三节 粘附剂

在免疫细胞化学工作中，由于标本（如切片）的脱落常影响工作的质量和速度，故粘附剂的选择和使用就显得较为重要。

一、铬矾明胶液

1. 试剂

铬矾 0.5g、明胶（gelatine）5g、H_2O 约 1 000mL。

2. 配制方法

在 1 000mL 的烧杯或烧瓶中，以 500～800mL H_2O 加热溶解明胶，待其完全溶解后，再加入铬矾。注意温度过高易使明胶烧糊，包被玻片时最好控制水温在 70℃。如有明显残渣，过滤后使用。

二、甲醛-明胶液

1. 试剂

40%甲醛 2.5mL、明胶 0.5g、蒸馏水至 100mL。

2. 配制方法

用少许蒸馏水（约 80mL）加热溶解明胶，待完全溶化后，加入甲醛，最后加入蒸馏水至 100mL 混匀即可。

三、多聚赖氨酸(poly-l-lysine,PLL)

1. 试剂

多聚赖氨酸 5g、蒸馏水约 1 000mL。

2. 配制方法

称取 PLL,溶于 H_2O,充分混合即可,此液浓度为 0.5%,可适当稀释配成 0.01%～0.5%浓度。4℃保存,也可－20℃备用。PLL 可反复冰冻,如无明显效果,工作液常再稀释 10～50 倍。

四、Vectabond 试剂

该试剂是 Vector 公司生产的一种新型玻片粘附剂。该试剂与一般的粘附剂不同,它是通过对玻璃表面起化学修饰作用,改变其表面的化学物理特性,使组织切片牢固地贴于玻璃片上,贴上后不易脱落,保留时间较久。一个试剂盒(7mL)可配成 350mL 工作液(用丙酮配)。处理载玻片前(事先酸处理),用染色缸装好各种液体,按下列程序进行:

(1) 干净载玻片经丙酮处理 5min;

(2) Vectabond 试剂工作液配制 7mL Vectabond 加 350mL 丙酮;

(3) 将载玻片用镊子夹住浸入 Vectabond 试剂 1～2 次;

(4) 蒸馏水洗 2 次,每次 5min;37℃干燥过夜,用铝箔包好,室温存放备用。注意:避免污染(尘埃等)。经上述方法处理的载片一般可存放半年以上。

第四节　封 固 剂

一、甘油-TBS 及甘油-PBS

1. 试剂

(1) 配方 1:甘油 90mL,0.01 mol/L TBS(或 PBS) 10mL;

(2) 配方 2:甘油 75mL,0.01 mol/L TBS(或 PBS) 25mL。

2. 配制方法

按比例将甘油和 TBS(或 PBS)充分混合后,4℃冰箱静置,待气泡排除后方可使用。

二、甘油-明胶(冻)

1. 试剂

明胶 10g、甘油 12mL、蒸馏水 100mL、香草酚少许。

2. 配制方法

称取 1g 明胶溶于温热(约 40℃)的蒸馏水中,充分溶解后过滤,再加入 12mL 甘油混合均匀。加入少许香草酚,这是为了防腐。

三、液体石蜡

液体石蜡因含杂质少,很少引起非特异性荧光,故常用于荧光组化及免疫荧光法时标本的封固。

四、DPX

1. 试剂

Distrene 10g、酞酸二丁酯 5mL、二甲苯 35mL。

2. 应用

DPX 为中性封固剂,用于多种染色方法且不易褪色,但组织收缩较明显,故应尽量使其为均匀的一薄层。DPX 现有商品出售,可直接应用。若过于粘稠,可加少量二甲苯稀释后应用。注意:二甲苯不可加得太多,二甲苯挥发后,片子上出现许多干燥的空泡,影响观察,遇有这种情况,可用二甲苯浸泡掉盖玻后重新封固。

五、抗荧光淬灭剂

详见本书第二章第四节。

第五节 其他辅助试剂

一、蔗糖溶液

免疫细胞化学中应用的蔗糖溶液常用浓度为 5%～30%。一般光镜研究,仅用 20%蔗糖处理即可。若制备电镜标本,在冰冻前最好经上行蔗糖溶液(5%、10%、

15%、20%及20%蔗糖-5%甘油等)处理,以确保其完好的细微结构。

1. 20%蔗糖液

(1) 试剂。蔗糖20g、0.1mol/L PB(pH 7.5)至100mL。

(2) 配制方法。先以少许0.1mol/L的PB溶解蔗糖,再加0.1mol/L PB至100mL充分混合,置于4℃冰箱保存。

(3) 应用。该液多用于光镜研究。标本在刚放入浓度如此高的蔗糖液时常浮在上面,当标本沉到底部时即可。通常光镜标本浸泡在20%蔗糖液中过夜,都能达到要求。

组织防冻液,PBS-蔗糖溶液:蔗糖20g、0.1mol/L PBS 100mL,溶解后高压消毒(12磅,20min。压力太高会使蔗糖焦化)。

2. 20%蔗糖-5%甘油

(1) 试剂。蔗糖20g、甘油5mL、0.1mol/L PB至100mL(约95mL)。

(2) 配制方法。先用少许PB溶解蔗糖后,再加入甘油,充分混匀,最后加入PB至100mL,于4℃保存备用。

(3) 应用。该液主要用于标本需做冰冻切片时的处理,常浸泡过夜(其他浓度的蔗糖常分别为2h左右)。蔗糖是一种廉价的防冻剂,兼有脱水的作用,它可减小标本在冰冻切片时冰晶形成的数量和大小,应用较为方便。若无试剂蔗糖(sucrose)也可用普通蔗糖(cane sugar)。配制好的蔗糖溶液,如放置时间超过一个月时,应重新配制。

二、Triton X-100(聚乙二醇辛基苯基醚)

免疫细胞化学中,Triton X-100常用浓度为1%和0.3%,但通常是先配制成30%的Triton X-100储备液,用时稀释至所需浓度。以下是30%Triton X-100的配制方法。

1. 试剂

Triton X-100 28.2mL、1mol/L PBS(pH 7.3)或0.05mol/L TBS(pH 7.4) 72.8mL。

2. 配制方法

取Triton X-100与PBS(或TBS)混合,置于37℃~40℃水浴中2~3h,使其充分溶解混匀。用前取该储备液稀释至所需浓度。

3. 应用

Triton X-100是一种非离子型表面活性剂(或称清洁剂),分子量为646.86($C_{34}H_{62}O_{11}$)。它能溶解脂质,以增加抗体对细胞膜的通透性。1%的Titon X-100常用于漂洗组织标本,0.3%的Triton X-100则常用于稀释血清、配制BSA等。

三、甲醇-H_2O_2 液

1. 试剂

纯甲醇 10mL、30%H_2O_2 0.1mL。

2. 配制方法

吸取 30%的 H_2O_2 0.1mL，加入 100mL 纯甲醇中，充分混匀即可，使 H_2O_2 终浓度为 0.3%（有的用 0.03%、0.5%等）。

3. 应用

甲醇-H_2O_2 处理组织标本，具有封闭内源性过氧化物酶活性的作用，但其具体机制至今仍不详。通常处理时间在室温下约为 5～30min。注意，用 H_2O_2 处理标本，对某些抗原的抗原性有影响，故建议在使用新的抗血清或抗原时，最好同时设立非处理对照组。

参考文献

[1] 贝蒂,等. 荧光原位杂交技术. 王瑛,张诗武,译. 天津：天津科技翻译出版公司,2003.

[2] 蔡文琴,王伯云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都：四川科学技术出版社,1994.

[3] 陈英玉. 细胞凋亡的检测. 北京：北京大学人类疾病基因研究中心,2003.

[4] 黄丽华,等. 生物光谱学实验. 合肥：中国科学技术大学出版社,2005.

[5] 李楠,等. 荧光探针应用技术. 北京：军事医学科学出版社,1998.

[6] 王春梅,等. 激光扫描共聚焦显微镜技术. 西安：第四军医大学出版社,2004.

[7] 许屏. 荧光和免疫荧光染色技术及应用. 北京：人民卫生出版社,1983.

[8] 袁兰. 激光扫描共聚焦显微镜技术教程. 北京：北京大学医学出版社,2004.

[9] 陈耀文,林珏龙,赖效莹,等. 激光扫描共聚焦显微镜系统及其在细胞生物学中的应用. 激光生物学报,1998,7(2):131—134.

[10] 李步洪,陆祖康,谢树森. 血啉甲醚的时间分辨荧光光谱研究. 光谱学与光谱分析,2003,23(2):331—333.

[11] 史庆华,等. 一种能精确检测人间期细胞核中21号染色体拷贝数的DNA探针. 中华医学遗传学杂志,1999,16(1):36—40.

[12] 史庆华,等. 用万能引物PCR法从YAC中分离制备荧光原位杂交探针的研究. 遗传学报,1998,25(5):403—408.

[13] 王鲲,等. 时间分辨荧光光谱中信噪比与测量精度的提高. 激光技术,2005,29(2):126—129.

[14] 王守业,等. 荧光光谱在蛋白质分子构象研究中的应用. 化学进展,2001,13(4):257—260.

[15] 王小红. 荧光定量PCR技术研究进展. 国外医学：分子生物学分册,2001,23(1):42—45.

[16] 谢小燕,夏宁邵. 生物学中荧光共振能量转移的研究应用进展. 生物技术通讯,2001,12(3):31—37.

[17] 杨大莉,景乃天. 荧光能量转移技术在生物学中的应用. 生命科学,2003,15:88—91.

[18] Alberto Diaspro. Confocal and Two-photon Microscopy: Foundations, Applications, and Advances. New York: Wiley-Liss, Inc., 2002.

[19] Richard P Haugland. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. 6th ed. 2000.

[20] J Paul Robinson, et al. Current Protocols in Cytometry. New York: John Wiley & Sons Press,1997.

[21] Klapper LN, et al. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. In Klein G,Woude V (eds): Advances in Cancer Research. New York: Academic Press, 2000: 25—79.

[22] B. Valeur. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Germany: Wiley-VCH 2002.

[23] Shaffer LG. Diagnosis of microdeletion syndromes by fluorescence in sity hybridization (FISH). Current protocols in human genetics. New York: John Wiley & Sons Inc.,1995.

[24] Stephen W Paddock. Confocal Microscopy Methods and Protocols. Totowa (New Jersey): Humana Press,1999.

[25] Andetsen T I, et al. Detection of c-erbB2 related protein in sera from breast cancer patients. Acta Oncologica, 1995, (34): 499—504.

[26] Bacus SS, et al. Expression of the erbB2 family of growth factor receptor and their ligands in breast cancers. Implication for tumor biology and clinical behavior. Am J Clin Pathol, 1994, 102(1): 13—24.

[27] Bretscher, A. Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. J Cell Biol, 1983, (97): 425—432.

[28] Cheng N-H, et al. Vascular invasion routs and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus in Nicotiana benthamiana. Plant J, 2000, 23(3): 349—362.

[29] Cooper JA, Hunter T. Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. Cell, 1981, (24): 741—752.

[30] Dankort D, et al. Grb2 and Shc adapter proteins play distinct roles in Neu (ErbB2)-induced mammary tumorigenesis: implications for human breast cancer. Mol Cell Biol, 2001, 21(5): 1 540—1 551.

[31] David Ehrhardt. GFP Technology for Live Cell Imaging. Current Opinion in Plant Biology, 2003, 6(6): 622—628.

[32] David J, et al. Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. Science, 2003, 300(5616): 82—86.

[33] Day RN. Imaging Protein Behavior Inside the Living Cell. Mol Cell Endocrinol, 2005, 230(1-2): 1—6.

[34] Duman J G, et al. Three dimensional reconstruction of cytoplasmic membrane networks in parietal cells. J Cell Sci, 2002, (115): 1 251—1 258.

[35] Forte J G, et al. The membrane recruitment and recycling hypothesis of gastric HCl secretion. Trends Cell Biol, 1996, (6): 45—48.

[36] Fu C, et al. Stabilization of PML nuclear localization by conjugation and oligomerization of SUMO-3. Oncogene, 2005, 24(35): 5 401—5 413.

[37] Graf R, et al. Live Cell Spinning Disk Microscopy. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2005, (95): 57—75.

[38] Hliscs R, et al. The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. Cytogenet Cell Genet, 1997, (76): 167—171.

[39] Hozier J C, Lindquist L L. Banded karyotypes from bone marrow: a clinical useful approach. Hum Genet, 1980, (53): 205—209.

[40] Hynes NE, et al. The biology of erbB2/neu/HER 2 and its role in cancer. Biochim Biophys Acta, 1994, (1198): 165—184.

[41] Itaya A, et al. Developmental regulation of intercellular protein trafficking through plasmodesmata in yobacco leaf epidermis. Plant Physiol, 1998, (118): 373—385.

[42] Jennifer Lippincott-Schwartz, et al. Studying Protein Dynamics in Living Cells. Nature Reviews Molecular Cell Biolog, 2001, 2(6): 444—456.

[43] Jentsch I, et al. Karyotyping mouse chromosomes by multiplex-FISH (M-FISH).

Chromosome Res,2001,9(3): 211—214.

[44] Jiri Lukas, et al. Mammalian Cell Cycle Checkpoints: Signalling Pathways and Their Organization in Space and Time. DNA Repair,2004,3(8—9): 997—1 007.

[45] Karhu R,et al. Quality control of CGH: impact of metaphase chromosomes and the dynamic range of hybridization. Cytometry,1997,(28): 198—205.

[46] Kohler RH, et al. Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. Science,1997,(276): 2 039—2 042.

[47] Kost B, et al. A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. Plant J,1998,(16): 393—401.

[48] Lee HC, et al. A study of H+ transport in gastric microsomal vesicles using fluorescent probes. Biochim Biophys Acta,1978,(508): 339—356.

[49] Marc J, et al. A GFP-MAP4 Reporter Gene for Visualizing Cortical Microtubule Rearrangements in Living Epidermal Cells. Plant Cell,1998,(10): 1 927—1 939.

[50] Mathur J, Nam-Hai Chua. Microtubule Stabilization Leads to GrowthReorientation in Arabidopsis Trichomes. Plant Cell,2000,(12): 465—477.

[51] Mercuri A,et al. Green fluorescent flowers. Plant Science,2002,(162): 647—654.

[52] Misteli T,et al. application of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. Nat Biotechnol,1997,15(10): 961—964.

[53] Mooseker M S, et al. Organization of an Actin filament-membrane complex. Filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells. J Cell Biol,1975,(67): 725—743.

[54] Pang S, et al. An Improved Green Fluorescent Protein Gene as a Vital Marker in Plants. Plant Physiol,1996,(112): 883—900.

[55] Park S H,et al. Green fluorescent protein as a signal for protein-protein interactions. Protein Sci,1997,15(11): 961—964.

[56] Ross JS, et al. Her-2/neu (c-erbB 2) gene and protein in breast cancer. Am J Clin Pathol, 1999(a),112(1): 53—67.

[57] Rouleau G A, et al. Alteration in a new gene encoding a putative membrane -organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. Nature,1993,(363):515—521.

[58] Sachs G, et al. Biochemistry of gastric acid secretion: H^+, K^+-ATPase. See Ref, 1989, (153): 229—253.

[59] Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185000-Mr tumor antigen. Nature, 1984,(312): 513—516.

[60] Shi Q, et al. Griseofulvin-induced aneuploidy and meiotic delay in male mouse germ cells: detected by using conventional cytogenetics and three-color FISH. Mutation Research, 1999, 441(2): 181—190.

[61] Shi Q, et al. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. Nature,2005,437(7061): 1 038—1 042.

[62] Shi Q, et al. Incidence of mosaic cell lines in vivo and malsegregation of chromosome 21 in lymphocytes in vitro of trisomy 21 patients: detection by fluorescence in situ hybridization on

binucleated lymphocytes. Hum Genet, 2000, 106(1): 29—35.

[63] Shi QH, et al. Chromosome Nondisjunction Yields Tetraploid Rather than Aneuploid Cells in Human Cell Lines. Nature, 2005, 437(7061): 1 038—1 042.

[64] Slamon DJ, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/neu oncogene. Science, 1987, (235): 177—182.

[65] Song Z, et al. A single amino acid change (Asp 53 → Ala53) converts Survivin from anti-apoptotic to pro-apoptotic. Mol Biol Cell, 2004, 15(3): 1 287—1 296.

[66] Song Z, et al. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. J Biol Chem, 2003, 278(25): 23 130—23 140.

[67] Toru Kumagai, et al. The role of distinct p185neu extracellular subdomains for dimerization with the epidermal growth factor(EGF) receptor and EGF-mediated signaling. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, (10): 5 526—5 331.

[68] Trofatter J A, et al. A novel moesin-, Ezrin-, radixin -like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. Cell, 1993, (75): 826.

[69] Urushidani T, et al. Characterization of an 80-kDa phosphor -protein involved in parietal cell stimulation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 1989, (256): 1 070—1 081.

[70] Urushidani T, et al. ME-3407, a new antiulcer agent, inhibits acid secretion by interfering with redistribution of H^+-K^+ ATPase. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 1997, (272): 1 122—1 134.

[71] Vain P, et al. The green fluorescent protein (GFP) as a vital screenable marker in rice transformation. Theor Appl Genet, 2000, (96): 164—169.

[72] Van der Geer P, et al. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. Annu Rev Cell Biol, 1994, (10): 251—337.

[73] X Michalet, et al. Quantum dots for live cell, in vivo imaging and diagnostics. Science, 2005, 307(5709): 538—544.

[74] Yamamoto T, et al. Similarity of protein encoded by the human c-erbB2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature, 1986, (319): 230—234.

[75] Yao J *, et al. Nek2A kinase regulates the localization of NuMAtrin to centrosome in mitosis. FEBS Lett, 2004, 575(1—3): 112—118.

[76] Yao X, et al. Biochemical characterization of Ezrin-Actin interaction. J Biol Chem, 1996, (271): 7224—7229.

[77] Yao X, et al. CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. Nat Cell Biol, 2000, (2): 484—491.

[78] Yao X, et al. Ezrin-calpain I interactions in gastric parietal cells. Am J Physiol Cell Physiol, 1993, (265): 36—46.

[79] Yao X, et al. Membrane cytoskeletal interaction in regulated exocytosis and apical insertion of vesicles in epithelial cells. In Current Topics in Membranes, ed. WJ Nelson, 1996, (43): 73—96.

[80] Yao X, et al. Polarized distribution of Actin isoforms in gastric parietal cells. Mol Biol Cell,

1995,(6): 541—557.

[81] Yao X, et al. Stimulation of gastric acid secretion by cAMP in a novel α-toxin-permeabilized gland model. Am J Physiol Cell Physiol,1996,(271): 61—73.

[82] Yao X, et al. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. Annu Rev Physiol,2003,(65): 103—131.

[83] Yao X, et al. The microtubule-dependent motor centromere-associated protein E (CENP-E) is an integral component of kinetochore corona fibers that link centromeres to spindle microtubules. J Cell Biol,1997,(139): 435—447.

[84] Yonghui Yang, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of receptor-interacting protein 3 (RIP3): identification of novel nuclear export and import signals in RIP3. Journal of Biological Chemistry,2004,(279): 38 820—38 829.

[85] Zhiyin Song, et al. Identification of a novel nucleolar localization signal and a degradation signal in Survivin-deltaEx3: a potential link between nucleolus and protein degradation. Oncogene,2004,24(16): 2 723—2 734.

[86] Zhou R, et al. Polarized distribution of IQGAP proteins in gastric parietal cells and their roles in regulated epithelial cell secretion. Molecular Biology of Cell,2003,(14): 1 097—1 108.

[87] Zhou R, et al. Characterization of protein kinase A-mediated phosphorylation of Ezrin in gastric parietal cell activation. J Biol Chem,2003,(278): 35 651—35 659.

[88] http://bbs. bbioo. com.

[89] http://biox. ustc. edu. cn/more. php? siteid = 429&tplset = schoolc2&siteid = 429&pid = 438&catalogid=1188.

[90] http://info. med. yale. edu/genetics/ward/tavi/FISH/PCRlbl. jpg.

[91] http://tech. bbs. bokee. com/ShowThreadMessage. do? m=1&threadID=75582&forumID=137&toPage=1.

[92] http://www. appliedbiosystems. com. cn.

[93] http://www. bdbioscience. com.

[94] http://www. bdbioscience. com/pdfs/brochures/02-7900030-68A1. pdf.

[95] http://www. bdbioscience. com/pdfs/brochures/03-7900030-16-A1. pdf.

[96] http://www. bdbioscience. com/pdfs/manuals/02-8100055-21A1rr. pdf.

[97] http://www. bdbioscience. com/pdfs/manuals/03-8100055-557740-Ar. pdf.

[98] http://www. bdbioscience. com/pdfs/manuals/05-790030-3A1. pdf.

[99] http://www. bdbioscience. com/pharmingen/protocols.

[100] http://www. biochinase. com.

[101] http://www. biochinese. com/Article_Print. asp? ArticleID=186.

[102] http://www. biochinese. com/Article_Print. asp? ArticleID=194.

[103] http://www. bio-equip. com/showarticle. asp? ID=453057779.

[104] http://www. bioguider. com/bbs/dispbbs. asp? boardID=17&ID=4137&page=8.

[105] http://www. biokemi. org/biozoom/2001_1/images/panteco_1. gif.

[106] http://www. biolab. com. cn/cn/lightools/Lightool. htm.

[107] http://www. biolab. com. cn/main. htm.

[108] http://www. bioon. com/experiment/image4/167670. html.

[109] http://www. bioon. com/experiment/imm5/86154. html.

[110] http://www. biopromoter. com/index. php?option=com_simpleboard&Itemid=89&func=view&view=threaded&id=1321&catid=3.

[111] http://www. cella. cn/book.

[112] http://www. chinainfo. gov. cn/data/200112/1_20011207_24234. html.

[113] http://www. chinalab. com. cn.

[114] http://www. daangene. com/detail. asp?id=54.

[115] http://www. eurogentec. com/module/images2/pna. gif.

[116] http://www. foodmate. net/yiqi/lihua/14101. html.

[117] http://www. forevetop. com/AMINCO-Bowman2. htm.

[118] http://www. genewindows. com/news/JSTJ/20041012164926. htm.

[119] http://www. genome. gov/Pages/Hyperion/DIR/VIP/Glossary/Illustration/Pdf/fish. pdf.

[120] http://www. instrument. com. cn/netshow/SH100324/index. asp.

[121] http://www. instrument. com. cn/show/download/html/003669. html.

[122] http://www. invitrogen. com.

[123] http://www. jingmei. com/site/site/companies/Quantumdot/Quantumdot. jsp.

[124] http://www. labmedicine. cn/lab_cn/_resources/images/pics/33/. %5CLarge%5C33-05. jpg.

[125] http://www. olympuschina. com.

[126] http://www. progame. com.

[127] http://www. sic. ac. cn/information/bulletin/2005/04/05. htm.

[128] http://www. thermo. com.

[129] http://www. zeiss. com. cn.

［Ｇｅｎｅｒａｌ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ］
书名＝细胞生物学荧光技术原理和应用
丛书名＝
作者＝刘爱平主编
出版社＝中国科学技术大学出版社
出版日期＝２００７
形态项＝ ３２０ ； ２６ｃｍ
页数＝３２０
原书定价＝ ２８．００
读秀号＝０００００６１６７１５６
ＳＳ号＝１１８８６８４５
ＩＳＢＮ＝ ７－３１２－０２０４４－５ ／ Ｑ２
分类号＝１５０７
主题词＝
参考文献格式＝刘爱平主编．细胞生物学荧光技术原理和应用．中国科学技术大学出版社，２００７．
简介＝本书共分三部分：第一部分介绍荧光的基本知识、发展史、荧光探针、活体荧光材料——绿色荧光蛋白（ＧＦＰ）及最新型荧光材料——量子点；第二部分介绍荧光技术在生命科学中的应用及荧光生物样品的制备方法；第三部分介绍了中国科学技术大学生命科学学院现已拥有的生物荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、细胞遗传工作站、活细胞荧光工作站等荧光检测仪器的基本原理、操作步骤及注意事项。